

جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ميسان

كلية التربية الاساسية / قسم العلوم العامة



"عزل وتوصيف الشيتوزان من مخلفات قشور الأسماك

المحلية ودراسة بعض خواصه الحيوية"

رسالة ماجستير تقدمت بها الطالبة

مريم يونس حسن

إلى مجلس كلية التربية الاساسية / جامعة ميسان

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في العلوم العامة التخصصية

إشراف

أ.د. وسن جعفر إبراهيم

2025 م

1447 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿هُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لَنَا نَافِلًا لِنَأْكُلَ مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَنَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ

حِلْيَةً تَلْبَسُونَهَا وَتَرَى الْفَلَكَ مَوَازِيرَ فِيهِ وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ وَلَعَلَّكُمْ

تَشْكُرُونَ ﴿﴾

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ

(سورة المائدة: الآية 1)



اقرار المشرف

اشهد ان إعداد هذه الرسالة الموسومة: "عزل وتوصيف الشيتوزان من مخلفات قشور الاسماك المحلية ودراسة بعض خواصه الحيوية"، والمقدمة من الطالب (مريم يونس حسن) تمت تحت اشرافي في كلية التربية الاساسية/ جامعة ميسان جزءاً من متطلبات نيل درجة الماجستير في العلوم العامة التخصصية.

التوقيع:

الاسم: أ.د. وسن جعفر ابراهيم

اللقب العلمي: استاذ

التاريخ: / / 2025

بناءً على التعليمات اشرح الرسالة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: أ.د. هاشم حنين كريم

اللقب العلمي: استاذ

رئيس قسم العلوم العامة

رئيس لجنة الدراسات العليا

التاريخ: / / 2025

إقرار لجنة المناقشة

نشهد اننا اعضاء لجنة المناقشة قد اطلعنا على الرسالة الموسومة: "عزل وتوصيف الشيتوزان من مخلفات قشور الأسماك المحلية ودراسة بعض خواصه الحيوية"، المقدمة من الطالب (مريم يونس حسن) وقد ناقشنا الطلب في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد انها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في العلوم العامة التخصصية.

التوقيع:	التوقيع:
الاسم واللقب العلمي:	الاسم واللقب العلمي:
التاريخ:	التاريخ:
عضو اللجنة	رئيس اللجنة

التوقيع:	التوقيع:
الاسم واللقب العلمي:	الاسم واللقب العلمي:
التاريخ:	التاريخ:
عضو اللجنة (المشرف)	عضو اللجنة

صادق مجلس الكلية على قرار اللجنة في جلسته المرقمة () والمنعقدة بتاريخ / / 2025.

التوقيع:
الاسم واللقب العلمي:
التاريخ: / / 2025.
عميد كلية التربية الاساسية

الإهداء...

إلى النور الأول في حياتي، إلى من كان دعاؤه سرّاً يُنير دربي، إلى والدي الغالي... .

وإلى... . نبع الحنان، إلى من كانت بسمته وجهها تطفئُ تعبي، ورضاها بلسماً لروحي وسلاماً، إلى أمي الحبيبة... .

وإلى... . أخي الراحل، إلى من غاب جسده وبقي أثره في قلبي افتقدتك في كل محطة من محطات هذا الإنجاز أسأل

الله أن يجعل قبرك روضة من رياض الجنة، وأن يجمعني بك في مستقر رحمته. وإلى إخوتي الأعزاء، سندي في

الحياة شكراً لكم من القلب، وكل ما أنجزته هو جزء منكم وبكم. إلى رفاق الطريق، أصدقائي النبلاء شكراً

لقلوبكم الصافية، وأيادكم التي خففت عني كثيراً. إلى من علموني أن العلم رسالة، وأن الكلمة أمانة، إلى معلّميّ

الأجلاء في كل المراحل، وفي كل نصيحة أتم من وضع الحجر الأساس في هذا البناء، وإلى من كانت دقيقة

الفكر، ومرشدة الروح، إلى أساتذتي الفاضلة، الأستاذة الدكتورّة وسن جعفر إبراهيم، لما احتضنتني بعلمٍ كافٍ،

وهمّة كافية، ووجهتي حتى أنضح الثمر إليكم جميعاً، أهدي هذا الإنجاز المتواضع، بكل فخر ومحبة، وأسأل الله

أن يجعله نافعاً، وأن يرزقني الإخلاص فيه، وأن يجزيكم عني خير الجزاء.

مريم

شكر و عرفان

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات، وبتوقيه تنال الغايات، له الحمد أولاً وآخراً، ظاهراً وباطناً، أن من علي بإتمام هذا العمل العلمي، ومنحني الصبر والعزيمة في طريق البحث والمعرفة. أرفع أسمى عبارات الشكر والتقدير إلى جامعة ميسان - كلية التربية الأساسية - قسم العلوم العامة، هذا الصرح الأكاديمي العظيم الذي احتضن رحلتي العلمية ووفر لي بيئة محفزة للإبداع والتميز. ولا يفوتني أن أخص بالشكر والعرفان رئيس القسم الأستاذ الدكتور هاشم، لما قدمه من دعم متواصل وتوجيهات سديدة كان لها بالغ الأثر في مسيرتي العلمية. كما أتوجه بخالص الامتنان إلى دائرة صحة ميسان، وخصوصاً مستشفى الطفل والولادة ومختبر الصحة العامة، لما وفره كادرهم من تسهيلات وتجهيزات علمية ساعدتني في إجراء التجارب وجمع البيانات.

وأخص بالشكر والعرفان إلى الأستاذ عباس والسبت سوزان في المختبر، على دعمهم العملي والإنساني، ومساهماتهم الفاعلة في نجاح هذا العمل. ولا أنسى أن أعبر عن تقديري للشركة العامة لتصنيع الحبوب في ميسان وبالأخص الاستاذ علي صالح ومعهد نفط ميسان، الاستاذ محمد هادي صنكور والأستاذ احمد عبد الواحد لما قدموه من تعاون وتسهيلات أغنت الجانب العملي من هذه الرسالة، وأسهمت في تحقيق أهدافها.

وأخص بالذكر مشرفتي الفاضلة الأستاذة الدكتورة وسن جعفر، التي كانت النبراس الذي أنار طريقي، والداعم الذي لم يبخل علي بخبرته وتوجيهاته القيمة منذ بداية العمل وحتى نهايته، فكانت مثلاً للعطاء العلمي والإنساني. ولا يسعني إلا أن أقدم أسمى آيات الشكر والامتنان إلى زملائي وأصدقائي الأعداء، الذين كانوا عوناً لي في مراحل البحث والدراسة، وإلى عائلتي الكريمة، التي كانت السند الحقيقي والدافع الأكبر للاستمرار، فغمروني بحببتهم وتشجيعهم ودعواتهم الصادقة. وفي الختام، أوجه شكري إلى كل من كانت له يد خفية أو ظاهرة في إنجاز هذا العمل، راجياً من الله أن يجعل هذا الجهد خالصاً لوجهه الكريم، وأن يجزي كل من قدم لي يد العون خير الجزاء.

"وما توفيقي إلا بالله، عليه توكلت وإليه أنيب."

مريم

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية إلى استخلاص الشيتوزان من قشور نوعين من الأسماك المحلية، الصبور (*Tenulosa ilisha*) والسمتي (*Cyprinus carpio*)، باستخدام الطريقة الكيميائية ودراسة بعض خصائصه الوظيفية والفيزيوكيميائية والبيولوجية. تضمنت خطوات الاستخلاص إزالة البروتين، ثم إزالة المعادن، تلتها عملية نزع الأسيتيل، وتم الحصول على شيتوزان بنسبة حاصل بلغت 16.56% لشيتوزان الصبور و29.55% لشيتوزان السمتي.

أظهرت الخصائص الفيزيوكيميائية انخفاض المحتوى البروتيني (0.014% للصبور و0.0014% للسمتي) وانخفاض نسبة الرماد (0.438% للصبور و0.427% للسمتي)، مما يدل على كفاءة عملية إزالة البروتين والمعادن. كما لم تسجل فروق معنوية في درجة نزع الأسيتيل إذ بلغت 86.19% لشيتوزان الصبور و85% لشيتوزان السمتي، وحسب هذه النتائج يمكن تصنيف الشيتوزان الحالي ضمن النوع عالي نزع الأسيتيل (Highly Deacetylated Degree; HDD).

وبيّنت نتائج تحليل FTIR ظهور الحزم المميزة لمجاميع الأمين (NH_2) والكاربونيل (C=O) والروابط (C-O-C)، مما يؤكد نجاح عملية نزع الأسيتيل وتحول الكيتين إلى شيتوزان ذي نقاوة عالية. كما أوضحت نتائج XRD امتلاك الشيتوزان درجة تبلور بلغت 64.42% للصبور و64.59% للسمتي، مما يشير إلى انتظام البنية البلورية الناتجة عن كفاءة خطوات الاستخلاص.

أظهرت النتائج كذلك امتلاك الشيتوزان قابلية ذوبان عالية في الوسط الحمضي (1% Acetic Acid)، حيث بلغت أكثر من 96% لكلا النوعين. كما أظهر شيتوزان السمتي وزناً جزيئياً ولزوجة أقل بشكل معنوي مقارنة بشيتوزان الصبور، إذ بلغت 126.765 KDa و30.477 cPs على التوالي، بينما بلغت في شيتوزان الصبور 226.1 KDa و51.126 cPs على التوالي.

فيما يتعلق بالخصائص الوظيفية، تفوق شيتوزان السمتي على شيتوزان الصبور في قابلية ربط زيت الزيتون، إذ بلغت النسبة 463.98% مقابل 337.3% على التوالي، في حين لم تظهر فروقات معنوية في قابلية ربط الماء، حيث بلغت 350.8% و360.9% على التوالي.

أما النشاط المضاد للبكتيريا، فقد أظهر شيتوزان السمتي قدرة عالية على تثبيط نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام *Escherichia coli* والبكتريا الموجبة لصبغة كرام *Staphylococcus aureus* عند تراكيز (0.25، 0.50، 0.75، 1.00، 1.50، 2.00 $\mu\text{g/ml}$) حيث بلغ قطر منطقة التثبيط لبكتريا E.

Staph. aureus (19.67، 18.00، 16.00، 15.33، 13.33، 12.67 mm) على التوالي، أما coli فقد بلغ قطر منطقة التثبيط (15.67، 15.33، 15.00، 14.00، 11.67 mm) على التوالي. بينما أظهر شيتوزان الصبور قدرة على تثبيط نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام عند جميع التراكيز، إذ بلغ قطر منطقة التثبيط (19.33، 18.33، 16.67، 15.33، 14.33 mm)، في حين أظهرت البكتريا الموجبة لصبغة كرام مقاومة لتأثير الشيتوزان المستخلص من الصبور ولم تسجل مناطق تثبيط.

تؤكد هذه النتائج أن مخلفات قشور أسماك الصبور والسمتي تمثل مصدرًا واعدًا لإنتاج شيتوزان عالي الجودة بخصائص فيزيائية وكيميائية ووظيفية وبيولوجية متميزة، مما يدعم إمكانية استخدامه في التطبيقات الصناعية والطبية والبيئية المختلفة.

المحتويات

الصفحة	الموضوع
ب	الاية
ج	الاهداء
د	الشكر وعرقان
هـ-ح	قائمة المحتويات
ح	قائمة الجداول
ط	قائمة الاشكال
4-1	الفصل الاول - المقدمة
2	1-1 المقدمة
4-3	2-1 الهدف من الدراسة
35-5	الفصل الثاني - مراجعة المصادر
6	1-2 الكايتين
8	2-2 الشيتوزان
11	3-2 مصادر الكايتين والشيتوزان
12	2-3-2 القشريات
13	2-3-2 قشور الاسماك
14	3-3-2 الحشرات
14	4-3-2 الفطريات
15	5-3-2 الرخويات
16	4-2 طرق استخلاص الشيتوزان
16	1-4-2 الطريقة الكيميائية لاستخلاص الشيتوزان
16	1-1-4-2 ازالة المعادن
17	2-1-4-2 ازالة البروتين
17	3-1-4-2 نزع مجموعات الاسيتيل
17	2-4-2 الطريقة الفيزيائية لاستخلاص الشيتوزان
18	1-2-4-2 المعالجة بالموجات فوق الصوتية
18	2-2-4-2 الضغط الهيدروستاتيكي العالي
19	3-2-4-2 الاستخلاص بطريقة المايكرويف
20	3-4-2 الطريقة البيولوجية لاستخلاص الشيتوزان
20	1-3-4-2 ازالة البروتين

الصفحة	الموضوع
21	2-3-4-2 ازالة المعادن
21	3-3-4-2 نزع مجموعات الاستيل
21	5-2 الخصائص الفيزيائية والكيميائية للشيتوزان
22	1-5-2 الخصائص الفيزيائية
22	1-1-5-2 الوزن الجزيئي
23	2-1-5-2 اللزوجة
24	3-1-5-2 درجة ازالة الاستيل
25	4-1-5-2 الخصائص الحرارية
26	2-5-2 الخصائص الكيميائية
26	1-2-5-2 الذوبان
27	2-2-5-2 سعة ربط الماء
28	3-2-5-2 درجة حموضة الشيتوزان
29	4-2-5-2 تفاعلات الشيتوزان
29	6-2 تطبيقات الشيتوزان
30	1-6-2 الطب والصيدلة
31	2-6-2 البيئة وتنقية المياه
32	3-6-2 عامل مضاد للميكروبات
33	4-6-2 التطبيقات الغذائية
34	5-6-2 التطبيقات الزراعية
35	6-6-2 مستحضرات التجميل
52-36	الفصل الثالث المواد وطرق العمل
37	1-3 المواد والاجهزة المستخدمة
37	1-1-3 الاجهزة المستخدمة
38	2-1-3 المواد الكيميائية المستخدمة
40	2-3 المواد الاولية
40	3-3 خطوات تحضير الشيتوزان من الكيتين
40	1-3-3 استخلاص الكيتين
40	1-1-3-3 ازالة البروتين
41	2-1-3-3 ازالة المعادن
42	2-3-3 انتاج الشيتوزان من الكيتين (نزع مجاميع الاستلة)
43	4-2 تقدير نسبة الحاصل

الصفحة	الموضوع
43	3-5 الخواص الفيزيوكيميائية للشيتوزان
43	3-5-1 تحديد محتوى الرماد
43	3-5-2 محتوى الرطوبة
44	3-5-3 تقدير اللزوجة
45	3-5-4 تقدير الوزن الجزيئي
45	3-5-5 قابلية ربط الماء
46	3-5-6 قابلية ربط الدهون
46	3-5-7 تقدير الذائبية
47	3-5-8 حيود الأشعة السينية (XRD)
48	3-5-9 المجهر الإلكتروني الماسح (SEM)
48	3-5-10 تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء (FTIR)
48	3-5-11 تقدير النتروجين الكلي باستخدام كدال
49	3-6 الخواص البيولوجية للشيتوزان
49	3-6-1 الفعالية المضادة للميكروبات
49	3-6-1-1 عزلات البكتيريا المرضية
49	3-6-1-2 تحضير وسط مولر هنتون
49	3-6-1-3 تنشيط البكتيريا
50	3-6-1-4 اختبار نشاط الشيتوزان المضاد للبكتيريا
50	3-6-2 إزالة الصبغة باستخدام الشيتوزان
51	3-6-3 تقدير الفعالية المضادة للاكسدة (DPPH)
52	3-7 التحليل الإحصائي
78-53	الفصل الرابع النتائج والمناقشة
54	4-1 الخواص الفيزيوكيميائية
55	4-1-1 نسبة الحاصل
55	4-1-2 الرطوبة
56	4-1-3 الرماد
56	4-1-4 الوزن الزيتي
57	4-1-5 محتوى البروتين
58	4-1-6 الذائبية
58	4-1-7 اللزوجة
59	4-1-8 قابلية ربط الماء والدهن

الصفحة	الموضوع
61	9-1-4 حيود الاشعة السينية (XRD)
65	10-1-4 المجهر الالكتروني الماسح (SEM)
65	11-1-4 تقنية تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء فورييه (FTIR)
70	2-4 الخصائص البيولوجية للشيتوزان
70	1-2-4 الفعالية المضادة للميكروبات
74	2-2-4 ازالة صبغة ازرق المثيلين
78-77	3-2-4 الفعالية المضادة للاكسدة
81-79	الفصل الخامس الاستنتاجات والتوصيات
80	1-5 الاستنتاجات
81	2-5 التوصيات
99-82	المصادر
139-100	الملاحق
A-B	الملخص الانكليزي

قائمة الجداول

الصفحة	الجدول
54	1-4 الخواص الفيزيوكيميائية للشيتوزان المعزول من قشور اسماك الصبور والسمتي.
68	2-4 المجاميع الوظيفية للشيتوزان المعزول من قشور اسماك الصبور والسمتي.
72	3-4 الفعالية المضادة للميكروبات (Antimicrobial activity) للشيتوزان المستخلص من قشور اسماك الصبور والسمتي.

قائمة الاشكال

الصفحة	الشكل
	الفصل الثاني
7	شكل 1-2 التركيب الكيميائي للكيتين
8	شكل 2-2 مصدر وتركيب الكيتين
9	شكل 3-2 التركيب الكيميائي للشيتوزان

الصفحة	الشكل
10	شكل 2-4 المجاميع الوظيفية القابلة للتحويل في الشيتوزان
12	شكل 2-5 المصادر الرئيسية للكيتين والشيتوزان
الفصل الثالث	
40	شكل 3-1 قشور الأسماك (A) الصبور (B) السمتي
41	شكل 3-2 إزالة البروتين من قشور أسماك (A) الصبور (B) السمتي
41	شكل 3-3 إزالة المعادن من قشور أسماك (A) الصبور (B) السمتي
42	شكل 3-4 إزالة الاستلة من الكيتين المستخلص من قشور أسماك (A) الصبور (B) السمتي
الفصل الرابع	
60	شكل 4-1 قابلية الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي على ربط الماء والدهن
63-62	شكل 4-2 حيود الأشعة السينية للشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور (A) والسمتي (B)
64	شكل 4-3 صور المجهر الإلكتروني الماسح للشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور (A) والسمتي (B)
66	شكل 4-4 أطياف الأشعة تحت الحمراء للشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور (A) والسمتي (B)
67	شكل 4-5 أطياف الأشعة تحت الحمراء للمشتقة الثانية للشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور (اللون الاسود) والسمتي (اللون الاحمر)
73	شكل 4-6 الفعالية المضادة للبكتيريا للشيتوزان التجاري والشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي
74	شكل 4-7 الفعالية المضادة للبكتيريا لتراكيز مختلفة من الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي
75	شكل 4-8 قدرة الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي على إزالة صبغة المثيلين الأزرق من الماء
75	شكل 4-9 كفاءة الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي على إزالة صبغة المثيلين الأزرق الماء خلال الوقت
77	شكل 4-10 الفعالية المضادة للأكسدة للشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي

المقدمة

Introduction



المقدمة

Introduction

أصبح البحث عن بدائل صديقة للبيئة وإنتاج مواد رخيصة ومستدامة لاستخدامها في العديد من التطبيقات الحيوية المختلفة مع بداية الثورة الخضراء هو الهدف الرئيسي للمجتمع العلمي، ولهذا السبب برزت المواد الحيوية كخيار رائع بسبب وفرتها وقابليتها للتحلل الحيوي وتوافقها الحيوي.

تعد المركبات البوليميرية ذات الأصول العضوية من المصادر النباتية (النشأ، السليلوز، اللكتين، البكتين... الخ) او الحيوانية (الجيلاتين والكولاجين) أو الأحياء الدقيقة (poly lactic acid & Polyhydroxyalkanoate) وغيرها هي مواد متجددة وفعالة حيويًا ومتوافقة نالت اهتمام كبير من الباحثين لكونها تحتوي على مجاميع وظيفية عديدة تكسبها خصائص كيميائية وفيزيائية وبيولوجية متميزة تسهل استخدامها في العديد من التطبيقات الطبية، الصيدلانية، الزراعة، صناعة الأغذية، صناعة الورق ومعالجة انواع مختلفة من الملوثات البيئية. (Mathihde, et.al. 2024).

حصلت زيادة كبيرة في الاستخدام العالمي للمواد الطبيعية خلال السنوات الأخيرة اذ بلغ حوالي 92.1 مليار طن في عام 2017 وبنسبة زيادة بلغت 254% مقارنة بـ 27 مليار طن في عام 1970 (United Nations, 2019). ونتيجة لذلك نشأ مفهوم الاستخدام الفعال والمستدام للموارد الطبيعية وفي هذا الأطار تلعب المخلفات الحيوية دورا رئيسيا في تطبيق الأقتصاد الحيوي القائم على اعادة استخدامها للحد من انتاج المخلفات.

شهد قطاع الأسماك تطور كبير وسريع نتيجة لزيادة الأستهلاك باعتبارها نظام غذائي متوازن وصحي ووفقا لمنظمة الأغذية والزراعة (Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO) شهد اجمالي انتاج مصائد الأسماك وتربية الأحياء المائية زيادة كبيرة تجاوزت الثمانية



أضعاف مدفوعا بالتقدم في تقنيات الصيد والتطورات السريعة في تربية الأحياء المائية (Puja, *et.al.* 2024). ونتيجة لذلك تنتج كميات كبيرة من مخلفات الأسماك سنويا والتي يتم التخلص منها بما في ذلك القشور (Markoof, *et.al.* 2020)؛ وذكر Qin, *et.al.* 2022 غالبا ما تعتبر قشور الأسماك مخلفات مهمة من صناعة وتربية الأحياء المائية ويقدر ما يتراوح بين 7.2 و 12 مليون طن سنويا من مخلفات الأسماك يتم التخلص منها عالميا.

تعد قشور الأسماك مصدرا للعديد من المكونات ذات الأهمية الحيوية مثل الكولاجين والذي يعتبر من أهم المصادر الحيوانية لخلوه من الأمراض حيوانية المنشأ (Yamura, *et.al.* 2022)، كما يعد الجيلاتين وهو أحد المشتقات الناتجة من التحلل الحراري للكولاجين والذي له تطبيقات حيوية عديدة في مجال صناعة الأغذية والصناعات الدوائية ومستحضرات التجميل كما يمكن ان تعزز مكملات الجيلاتين صحة المفاصل والعظام (Ideia, *et.al.* 2020).

تعتبر قشور الأسماك مصدرا مهما للـ Hydroxyapatite والذي يعتبر بديل امن عن الـ Hydroxyapatite البقري والصناعي حيث لم يظهر تأثيرا سمييا على حيوانات التجارب كما أظهر توافقا حيويا مقبولا واستخدم في تطوير ببتيد رابط للكالسيوم وتحضير منتجات صيدلانية تعزز امتصاص الكالسيوم في الجسم (Lin, *et.al.* 2020).

كما وتحتوي قشور الأسماك على الكايتين الذي يعتبر مادة مهمة للغاية نظرا لخصائصه الحيوية والعلاجية وتتعدد استخدامات الكايتين ومشتقاته في العديد من الصناعات الطبية والصيدلانية ومستحضرات التجميل والمستحضرات الغذائية... وغيرها (Coppla, *et.al.* 2021).

الشيتوزان يعتبر من اهم مشتقات الكايتين يتم تحضيره بإزالة الأستلة بطرق مختلفة (انزيمية ، كيميائية أو بيولوجية) يتميز بخصائص بيولوجية عديدة بسبب تركيبه الكيميائي مما



يسهل تحويله الى العديد من المركبات الوظيفية ذات الفعالية الحيوية حيث يمكن ان يستخدم الشيتوزان او المركبات القائمة عليه في تغليف الأغذية (Pech-Cohuo, *et.al.* 2022) وتوصيل الأدوية وكمكون في عوامل وقف النزيف وضمادات الجروح وكمواد للجراحة بدون خيوط جراحية (Hasnain, *et.al.* 2021) كما يمكن استخدامه مباشرة كمكون من مكونات الأغذية الوظيفية والتغذية العلاجية والوقائية بالإضافة الى قابليته على الارتباط بالحوامض الدهنية والصفراوية والفسفوليبيدات مما يجعله من الممكن علاج مرض الاضطرابات الهضمية وخفض مستويات الكوليستيرول وعلاج التهاب المفاصل وهشاشة العظام. (Raza, *et.al.* 2022; Maleki, *et.al.* 2020).

تعد الأسماك واحدة من اهم الأغذية بالنسبة للمستهلك العراقي فهي عنصر غذائي مهم في الأقتصاد العراقي نظرا لتوفر مصادر المياه وتنوعها ، ومن خلال الأحصائيات التي قامت بها مديرية الأحصاء الزراعي في الجهاز المركزي للأحصاء وبالتعاون مع وزارة الزراعة قدر حجم استهلاك لحوم الأسماك بـ 81043 طن لسنة 2021 وهذه الكمية اخذت بالزيادة. ويترتب على ذلك زيادة في حجم المخلفات التي تعتبر ثقل على البيئه يتوجب ايجاد السبل الكفيلة للتخلص منها بشكل امن من جهة والاستفادة منها في انتاج مواد مفيدة من جهة اخرى ونتيجة لقلة الدراسات المتعلقة في التخلص من مخلفات الأسماك المحلية لذلك هدفت الدراسة الحالية الى :

- 1- تحضير الشيتوزان من قشور بعض الأسماك المحلية بالطريقة الكيميائية وتشخيصه باعتماد الطرق الحديثة.
- 2- دراسة بعض الصفات الكيميائية والفيزيائية للشيتوزان المحلي.
- 3- دراسة بعض الصفات الحيوية والوظيفية للشيتوزان المحلي.

الفصل الثاني

مراجعة المصادر

Review sources

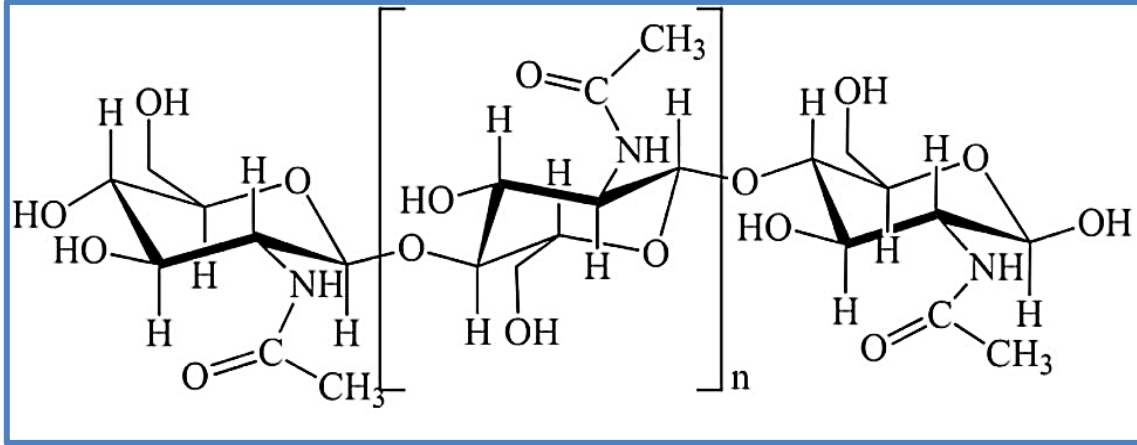


2-1- الكيتين : $(C_8H_{13}O_5N)_n$

أكتشف الكيتين لأول مرة في عام 1799 من قبل العالم الإنجليزي هاشيت *Hatchett*، حيث قام بوصف مادة ذات مقاومة عالية للمواد الكيميائية التقليدية. ورغم ذلك، لم تستمر أبحاثه في هذا المجال. لاحقاً، في عام 1811، تمكن عالم الطبيعة الفرنسي هنري براكونو من عزل مادة ليفية من نوع معين من الفطريات، وأطلق عليها اسم "الفطر"، وقد لاحظ أنها غير قابلة للذوبان في المحاليل الحمضية المائية. وفي عام 1823، أظهرت دراسات أخرى وجود نفس المادة في بعض الحشرات مثل الخنافس، وأطلق عليها اسم "كيتين"، المشتق من الكلمة اليونانية *kitos* والتي تعني "سترة" أو "غطاء" (Hassainia, 2018; Aljawish, 2013).

فيما بعد، اكتشف العالم الفرنسي لاسين *Lassin* احتواء الكيتين على عنصر النيتروجين، وعند معالجته بمحلول قلوي قوي تم الحصول لأول مرة على الشيتوزان، حيث تميز المركب الناتج بقابليته للذوبان في الأحماض العضوية. كما قام العالم *Selies F*. بتعريف الشيتوزان على أنه الشكل منزوع الأستيل من الكيتين، وهو الاسم الذي استخدم لاحقاً لوصف هذا المركب (Hassainia, 2018).

يعتبر الكيتين أكثر البوليمرات الطبيعية وفرة بعد السليلوز، وهو يشكل أحد المكونات الرئيسية للقشرة المتصلبة أو الهيكل الخارجي للحيوانات القشرية كالأسمك ومفصليات الأرجل مثل الحشرات، وبعض اللافقاريات (Invertebrates) مثل (سرطان البحر، الجمبري و الجراد) وقد يدخل في بنية الجدار الخلوي لكثير من الأحياء الدقيقة وبعض أنواع الفطريات مثل فطر (Román- (Aspergilla's Niger (Doval et al., 2023). ومن الناحية البنوية فإن الكيتين عبارة عن متعدد السكاريد أميني Amino polysaccharides ينتج من ارتباط الوحدات المونوميرية N-acetyl-D-glucosamine بواسطة اصرة كلايكوسيدية من نوع $(\beta-1,4)$.

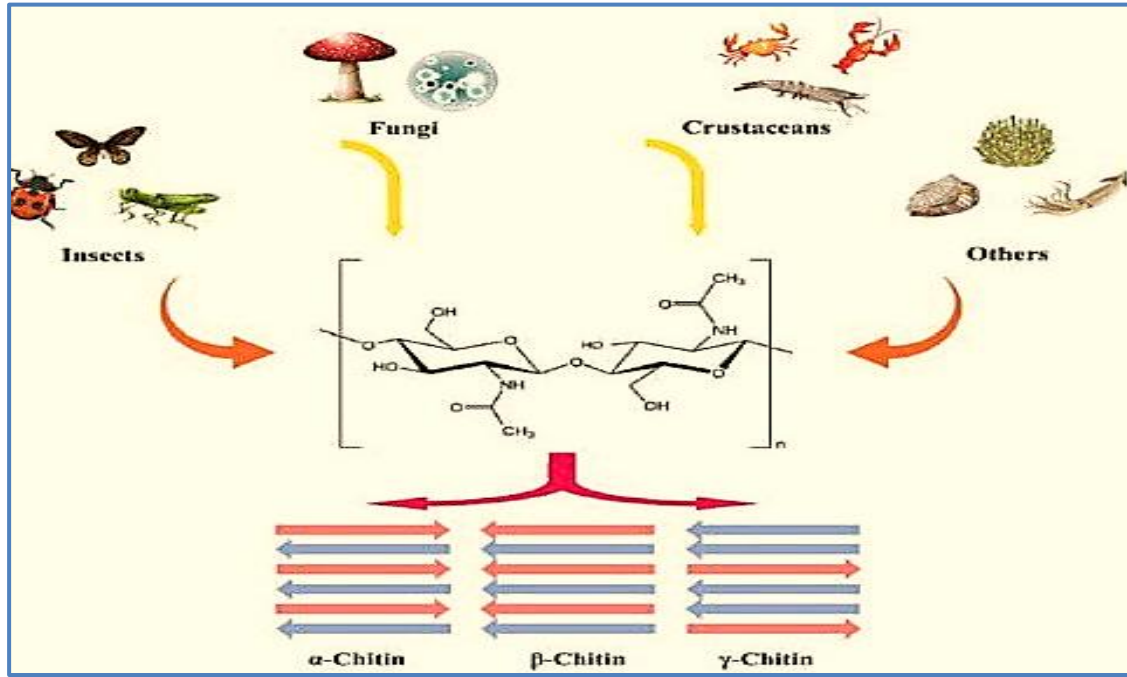


شكل (2_1)

التركيب الكيميائي للكيتين (Islam, et.al. 2017).

تدور وحدات السكر الفردية في بنيته بزواوية 180° بالنسبة لبعضها البعض ويشكل كل زوج ثنائي السكاريد N,N'-diacetylchitobiose بحيث تكون كل وحدة سكرية مقلوبة بالنسبة لجيرانها ويؤدي هذا الهيكل الى استقرار الأشرطة نتيجة لتكون الروابط الهيدروجينية فيما بينها (Daniel,E.A. & Michael,R.H. 2016).

يوجد الكيتين في الطبيعة بثلاث اشكال بلورية مختلفة هي الفا كيتين وبيتا كيتين وكاما كيتين اعتمادا على محاذات السلاسل البلورية ومصدرها (شكل 2-1). يعتبر الألفا كيتين هو الشكل الأكثر وفرة في الطبيعة ويتميز بترتيب متعاكس للسلاسل الجزيئية وهو شائع في المفصليات والقشريات، أما البيتا كيتين يكون ذو سلاسل متوازية ويوجد في الدياتومات البحرية ، بينما الكاما كيتين فهو شكل يجمع بين كلا الترتيبين السابقين ويوجد في الفطريات والخميرة (شكل 2-2) (Schafer, et.al. 2025) .

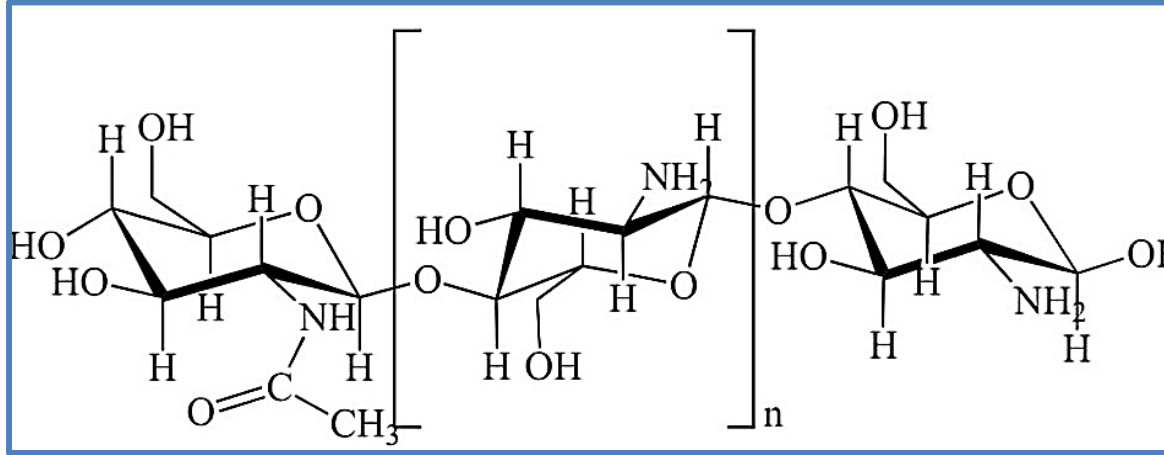


شكل (2-2)

مصدر وتركيب الكيتين (Schafer, et.al. 2025).

2-2- الشيتوزان Chitosan : $(C_6H_{11}O_4N)_n$

يعد الشيتوزان أحد البوليمرات الحيوية الطبيعية التي لها أهمية كبيرة خاصة في المجالات الطبية الحيوية، نظراً لخواصه الكيميائية والفيزيائية المتميزة (Dutta, 2016). وهو عبارة عن بوليمر كربوهيدراتي خطي مشتق من الكيتين، تركيبه الكيميائي يتكون من ارتباط وحدتين فرعيتين من الـ D- 2-Amino-2-(glucoseamine) deoxy-D-glucopyranose و N-acetyl-D-glucosamine بواسطة الرابطة الكلايكوسيدية (1,4-β)

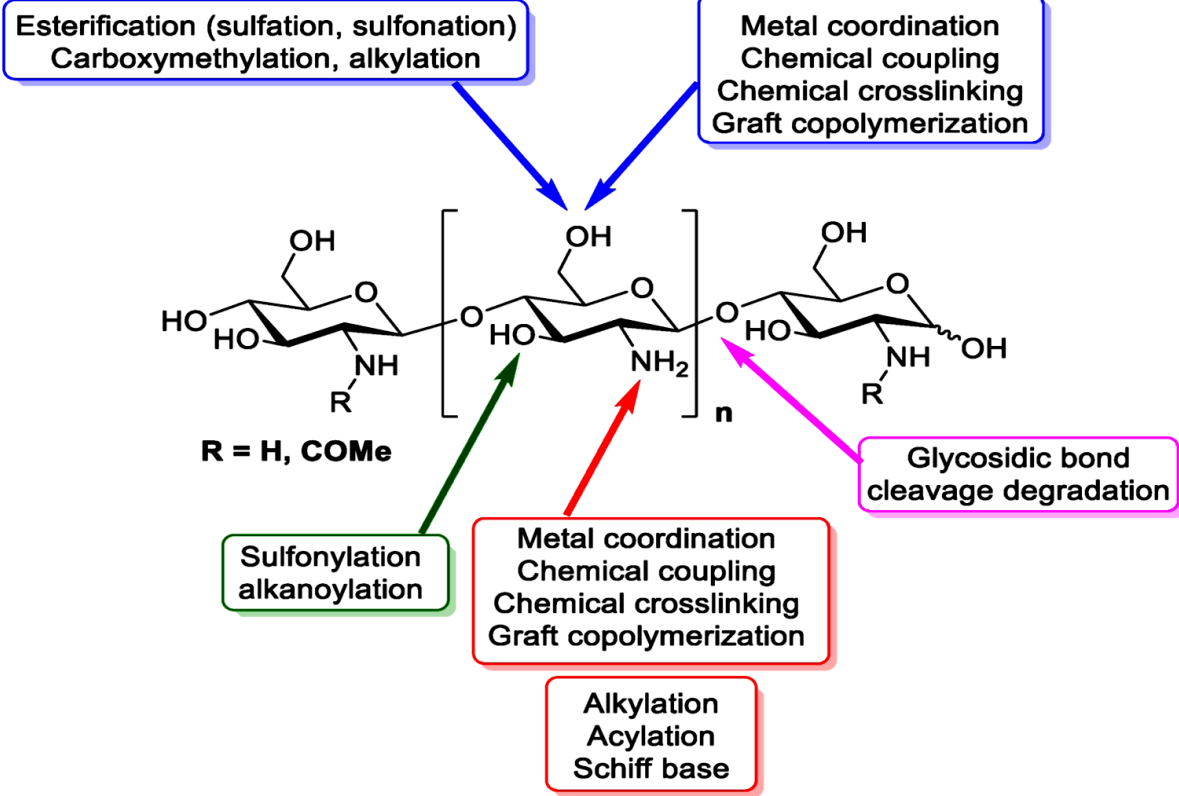


شكل (2-3)

التركيب الكيميائي للشيتوزان (Islam, et.al. 2017).

وبشكل عام تصنف المادة على انها شيتوزان اذا كانت تحتوي في تركيبها على نسبة أقل من 50% من N-acetyl-D-glucosamine وتصنف على انها كاييتين اذا كانت النسبة 50% أو أكثر (Doval, et.al. 2023).

يحتوي الشيتوزان على ثلاث مجاميع وظيفية تشمل المجاميع الأمينية Amino groups و مجاميع الهيدروكسيل الأولية والثانوية Primary and secondary hydroxyl groups مما يسهل تحويره كيميائياً (شكل 2-4) كما تؤثر على قابلية ذوبانه وصفاته الميكانيكية ، في البيئات الحمضية يكون الشيتوزان اكثر قابلية للذوبان من الكاييتين والسبب في ذلك يعود الى بروتونات مجموعة -NH₂ عند الموضع C1 لوحدة تكرار D-glucosamine مما يحول المركب الى اليكترولايت في الظروف الحامضية (Sharif, et.al. 2018).



شكل (2-4)

المجاميع الوظيفية القابلة للتحويل في الشيتوزان (Aranaz, et.al. 2021)

يؤثر مصدر وطريقة استخلاص الشيتوزان بشكل مباشر على خواصه الكيماوية والفيزيائية مثل حجم الجسيمات والوزن الجزيئي والبنية البلورية ومستوى نزع الأسيتيل ومساحة السطح والتي تلعب دورا رئيسيا في تحديد الفعالية الحيوية للشيتوزان ونطاق تطبيقاته.

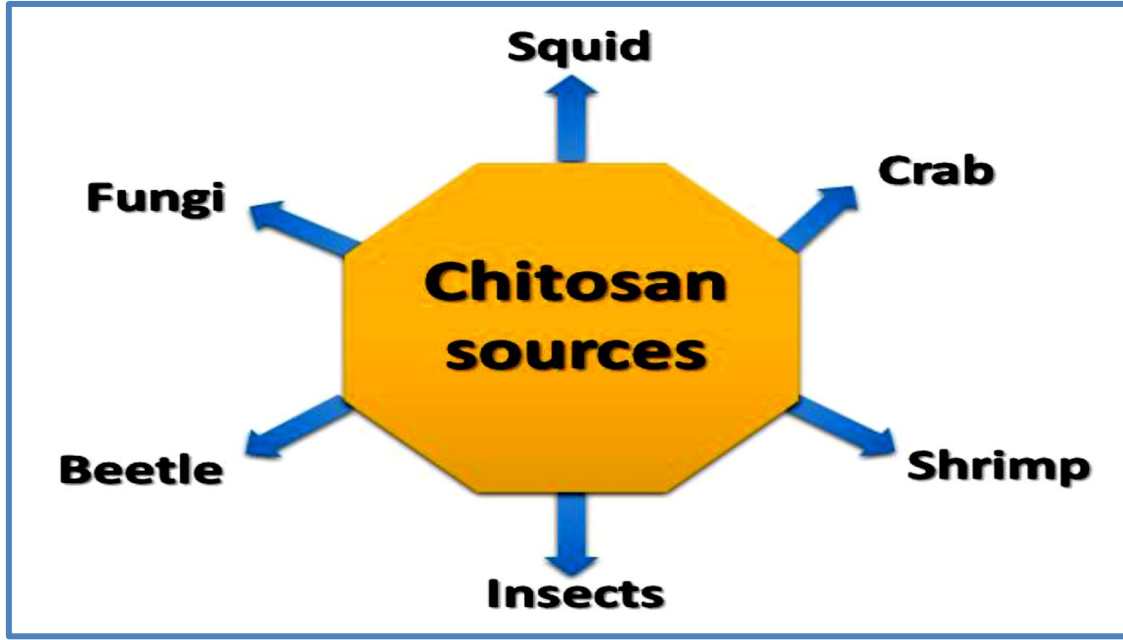
يتراوح الوزن الجزيئي للشيتوزان بين 20-1200 كيلودالتون اعتمادا على عدد الوحدات الأحادية في البوليمر الحيوي (Kulikov, et.al. 2006) ؛ وعلى أساس هذا التنوع يمكن تصنيف الشيتوزان الى ثلاثة أنواع أساسية وفقا لنطاقات أوزانها الجزيئية الى شيتوزان منخفض الوزن الجزيئي (LMWC) أقل من 150 كيلو دالتون والشيتوزان متوسط الوزن الجزيئي (MMWC) 150-700 كيلو دالتون والشيتوزان عالي الوزن الجزيئي (HMWC) أكبر من 700 كيلو دالتون (Minh, et.al. 2020). تشترك أنواع الشيتوزان الثلاثة في كونها متوافقة حيوياً Biocompatible وغير سامة Nontoxic وتمتلك فعالية



مضادة للميكروبات (فطريات، بكتريا، وفيروسات) (Doval, et.al. Antimicrobial activity (2023) ؛ بينما تتفاوت قابليتها كمادة مضادة للأكسدة حيث يكون MMWC ذات فعالية عالية و HMWC ذات فعالية أقل ويعود السبب في ذلك الى ان السلاسل الكبيرة في الشيتوزان عالي الوزن الجزيئي تتشأ روابط هيدروجينية داخل الجزيء أكثر من تلك الموجودة في الشيتوزان منخفض الوزن الجزيئي مما يجعل المجموعات التفاعلية أقل سهولة ونتيجة لذلك تظهر عينات الشيتوزان عالي الوزن الجزيئي نشاطاً مضاداً للأكسدة أقل أهمية من تلك الموجودة في الشيتوزان منخفض الوزن الجزيئي والذي يظهر ذوباناً عالياً، ومحاليل مائية ذات لزوجة منخفضة، ونفاذية متزايدة، مما يمنحه امكانات هائلة للاستخدام في الصناعات الغذائية والطبية والزراعية (Aranaz, et.al. 2021).

2-3- مصادر الكيتين والشيتوزان:

يعد الكيتين والشيتوزان من البوليمرات الحيوية الصديقة للبيئة لكونها تتميز بقابليتها على التحلل الحيوي لذلك نالت اهتمام العديد من الباحثين لدراسة اصولهما ونتاجهما. يوجد الكايتين ومشتقاته في كل مكان حول العالم وهو ثاني اكثر الجزيئات الحيوية وفرة في البيئة بعد السليلوز إذ يقدر انتاجه السنوي بما يتراوح بين 10^{11} - 10^{14} طن (Bastiaens. et.al. 2019) ؛ يعمل الكايتين كقالب لعمليات التمدن الحيوي مثل التكلس والسيليكا لذلك تفسر هذه الظاهرة وجود الكايتين والشيتوزان كمكونات اساسية في الهياكل الخارجية الصلبة للعديد من الكائنات الحية (Doval, et.al. 2023) ؛ أجريت دراسات عديدة خلال العشرين سنة الماضية مسلطة الضوء على انتاج الكايتين والشيتوزان من مصادر مختلفة (شكل 2-5) مثل أصداف القشريات ((Sarif, et.al. 2018) ، والحشرات (Liu, et.al.; 2012) ، وجدران خلايا الطحالب الخضراء والفطريات (Synowiecki & Al-Khateeb, 1997; Chobot, et.al. 1995) .



شكل (2_5)

المصادر الرئيسية للكيتين والشيتوزان (Hemmami, et.al. 2024)

2-3-1- القشريات Crustaceans

تتميز الهياكل الخارجية للقشريات بما في ذلك السلطعون Crab والروبيان Shrimp وجراد البحر Crayfish بأحتوائها على نسبة عالية من الكيتين حيث تتراوح نسبته بين (20-30) % لذلك يعتبر الكيتين والشيتوزان المستخرج من مخلفات القشريات الخيار الأمثل نظراً لتوفر هذه المصادر ، وقدرتها على التجدد، وانخفاض تكلفتها كما تعتبر طريقة بديلة للتخلص السليم من المخلفات الصلبة الناتجة من صناعة صيد الأسماك (Casadidio, et.al.; 2019) ، لذلك قام العديد من الباحثين وفي مناطق مختلفة من العالم بدراسة افضل الطرق لأستخلاص الشيتوزان من القشريات وأستخدامه في التطبيقات الحيوية والطبية (Hong Partarakere & Riyaphan, 2008; Islam, et.al. 2011; Walke, et.al. 2015) وذكر (Jeyanth Allwin, et.al. (2015) ان معالجة قشور الروبيان كيميائياً لأستخلاص الكيتين والشيتوزان تعتبر الطريقة الأفضل للتخلص من هذه المخلفات من جهة والأستفادة من خصائص الشيتوزان الحيوية من جهة اخرى.



ذكر Hassan, et.al., (2022) امكانية عزل الشيتوزان من قشور السلطعون والروبيان من الأسواق المحلية في ماليزيا واستخدامها بنجاح كمخثر حيوي لأزالة العكارة. وأظهرت النتائج التي حصل عليها Ogretman, et.al., (2022) من استخلاص الشيتوزان من مخلفات قشور الروبيان الوردي Pink Shrimp (*Parapenaeus long ireostris*) في تركيا ان نسبة الحاصل بلغت 18.82 %، ودرجة نزع الأستلة 81.50 % ووزن جزيئي بلغ 310 كيلو دالتون. كما استطاع عبد الكريم، وآخرون (2017) من عزل الشيتوزان من قشور الروبيان في مدينة البصرة بنسبة حاصل بلغت 15% ودرجة ازالة مجاميع الأستلة بلغت 98% ووزن جزيئي 17.782 كيلو دالتون.

2-3-2- قشور الأسماك *Fish scales*:

تعتبر قشور الأسماك مخلفات ناتجة من صناعة الأسماك حيث يقدر انتاجها العالمي السنوي بأكثر من 7.2-12 مليون طن تطرح في البيئة مما تسبب مخاطر بيئية كبيرة جداً بسبب تحللها البيولوجي البطيء، وزيادة متطلبات الـ COD (Chemical Oxygen demand) و BOD (Biochemical Oxygen demand) (Salindeho, et.al. 2022).

تحتوي قشور الأسماك في تركيبها على العديد من المكونات الفعالة وظيفياً مثل البروتينات 30-40% والكايتين 20-30 % لذلك فإن استخلاص هذه المركبات من مخلفات الأسماك سيكون له تأثيرات ايجابية بيئياً واقتصادياً . أستطاع Kumari & Rath, (2014) من استخلاص وتوصيف الكايتين والشيتوزان من قشور أسماك *Labeo rohita* . وتمكن Kumaria. Et.al. (2015) من استخلاص الشيتوزان بدرجة نزع الأستلة بلغت 61 % من مخلفات قشور الأسماك المتاحة في الأسواق المحلية في الهند.



كما قام (Aichayawanich & Saengprapaitip, 2019) بأستخلاص الشيتوزان من قشور الأسماك الناتجة من معامل تصنيع الأسماك في تايلاند. واستخدم (Alrman, et.al., 2023) معالجات كيميائية مختلفة لغرض أمثلة ظروف استخلاص الكايتين والشيتوزان من حراشف اسماك *Tilapia*.

2-3-3- الحشرات *Insects*:

ظهرت الحشرات كمصدر بديل لإنتاج الشيتوزان بفضل تنوعها البيولوجي الكبير، حيث تشكل أكثر من 95% من مجموع أنواع الكائنات الحية. تحتوي بشرة الحشرات على مواد غير عضوية أقل مقارنة بأصداف القشريات مما يسهل إزالة المعادن اثناء عملية استخلاص الكيتين كيميائياً، بالإضافة الى ان استخلاص الكايتين والشيتوزان من الحشرات يعتبر طريقة امنة في مكافحة الآفات الحشرية الزراعية (Casadidio et. al., 2019).

تتفاوت نسب الكايتين الموجود في الحشرات حسب النوع والمرحلة العمرية، وقد أظهرت الدراسات أن خنفساء البطاطس مثلاً تحتوي على نسبة كيتين تبلغ 7% في اليرقات و20% في الخنافس البالغة، بينما تصل نسبة تحويل الكيتين إلى شيتوزان إلى 72% في الخنافس البالغة و67% في اليرقات (Hemmami, et.al., 2024)؛ كما تشير الأبحاث الى ان الشيتوزان المشتق من الحشرات يظهر خصائص مشابهة ان لم تكن متفوقة على الشيتوزان المشتق من مصادر أخرى فيما يتعلق بالتوافق الحيوي والنشاط المضاد للميكروبات والقابلية على التحلل الحيوي (Wang, et.al. , 2020 ; Schafer, et.al. , 2025).

2-3-4- الفطريات:

تنتج صناعات التكنولوجيا الحيوية وتخمير الفطريات عند انتاج الخبز والبيرة والمضادات الحيوية وغيرها من الصناعات التخمرية الاف الأطنان من الكتلة الحيوية الفطرية، وذكر (Huet, et.al.,



(2020) ان الكتلة الحيوية الفطرية الناتجة من انتاج البنسلين بلغت أكثر من مليار طن سنوياً وعادة ما يتم التخلص منها أما رميها كمخلفات أو حرقها . طُرحت حلول عديدة للتخلص من هذه المخلفات وكان استغلالها في انتاج الكايتين والشيتوزان هو أحد الحلول للأستفادة منها حيث أظهرت دراسات عديدة ان متوسط محتوى الكايتين في جدران خلايا العديد من الفطريات يتراوح بين 10-16 % بينما يتراوح محتوى الشيتوزان بين 26-28 % (Jucker, et.al., 2020). أستطاع (John, et.al., 2020) استخلاص الشيتوزان من الفطر *Termitomyces titanicus* وبمعدل استخلاص بلغ 30.04 % ؛ بينما قام Shahadha, et.al., (2023) بعزل الشيتوزان من سيقان المشروم *Agaricus bisporus* بدرجة نزع الأستلة بلغت 83% ووزن جزيئي بلغ 46.922 كيلو دالتون.

من العيوب التي تحدد استخدام الكتلة الحيوية الفطرية كمصدر للكايتين والشيتوزان هو وجود انواع ممرضة للأنسان والحيوان مثل فطر *Rhizopus oryzae* يسبب داء الفطريات المخاطية الرئوية للأنسان، لذلك ينبغي اتخاذ تدابير سلامة عالية عند التعامل مع هذه الفطريات (Kaczmarek, et.al. 2019).

2-3-5- الرخويات *Mollusks*:

توفر أنواع عديدة من الرخويات مصدراً إضافياً للشيتوزان مثل *Sepia kobeensis* , *Sepia* spp., *Loligo lessiana* and *Loligo formosana* من (Al Sagheer, et.al., 2009) تمكن . الذي تميز بمعدل نزع الأستلة بلغت 85.55 % ووزن جزيئي بلغ 322.04 كيلو دالتون وكان النشاط المضاد للأكسدة أعلى من النشاط المقدر للشيتوزان التجاري.



2-4- طرق استخلاص الشيتوزان

كما ذكرنا سابقاً أن الهياكل الخارجية من القشريات مثل سرطان البحر، جراد البحر، الروبيان وقشور السمك تُعد من المصادر المهمة لإنتاج الكيتين، ولكون هذه الكائنات تمتلك هياكل خارجية غنية بالبروتينات، الكيتين، وكربونات الكالسيوم التي ترتبط معاً لتكون الغلاف الخارجي. (بن عمر، 2024) وبالنظر لارتباط البروتين والكيتين معاً، فإن فصل الكيتين من القشرة يتطلب إزالة البروتينات والمعادن، وفي بعض الأحيان يتم إزالة اللون والأصباغ. (Seenuvasan et al., 2020). تشير المصادر إلى اعتماد ثلاث طرق مختلفة لاستخلاص الكيتين وتحويله إلى شيتوزان، وهي الطرق الكيميائية، والفيزيائية، والحيوية (Hamed et al., 2016).

2-4-1- الطريقة الكيميائية لاستخلاص الشيتوزان

تعد الطريقة الكيميائية الأكثر استخداماً على نطاق واسع لاستخلاص الشيتوزان، نظراً لفعاليتها العالية في فصل الكيتين وتحويله إلى شيتوزان نقي يناسب التطبيقات الصناعية والطبية. تتضمن الطرق الكيميائية استخدام حوامض وقواعد قوية لإذابة كربونات الكالسيوم والبروتينات على التوالي. وعلى الرغم من عيوب هذه الطريقة مثل التأثير البيئي، إلا أن قصر مدة الاستخلاص يجعلها أكثر طرق المعالجة شيوعاً تجارياً (El Knidri et al., 2018). تتكون هذه الطريقة من ثلاث مراحل رئيسية: إزالة المعادن، إزالة البروتين، ونزع مجموعات الأسيتيل.

2-4-1-1- إزالة المعادن (Demineralization):

أظهرت دراسة (Al-Saad et al., 2017) أن قشور الروبيان نقعت في محلول HCl بتركيز 4% بنسبة حجم إلى وزن 1:14 لمدة 24 ساعة، مما أدى إلى إزالة فعالة للمعادن، ثم غسل الناتج بالماء



المقتر. بالمقابل، أوضحت دراسة (Arbia et al., 2013) أن قشور الأسماك عولجت بمحلول HCl بتركيز M 1 لمدة ساعتين عند 25°C ، وحقت إزالة معادن بنسبة 94%.

2-1-4-2- إزالة البروتين (Deproteinization):

وفقاً لدراسة (Ben Omar, 2024)، عولج الراسب الناتج من نزع المعادن بمحلول NaOH بتركيز 5% بنسبة حجم إلى وزن 1:12 لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة، مع الغسل بالماء المقطر حتى تعادل pH. بينما استخدمت دراسة (Seenuvasan et al., 2020) محلول NaOH بتركيز 6% لمدة ساعتين عند 60°C ، محققة كفاءة إزالة بروتين بلغت 89%.

2-1-4-3- نزع مجموعات الأسيتيل (Deacetylation):

أظهرت دراسة (Al-Saad et al., 2017) أن معالجة الكيتين بمحلول NaOH بتركيز 50% بنسبة 1:10 عند 100°C لمدة 20 ساعة مع التحريك المستمر أدت إلى إزالة مجموعات الأسيتيل بنسبة 98.5%، مع غسل الناتج وتجفيفه عند 45°C للحصول على شيتوزان عالي النقاوة. في المقابل، استخدمت دراسة (Bashiri et al., 2025) محلول NaOH بتركيز 60% عند 90°C لمدة 6 ساعات لاستخلاص الشيتوزان من قشور الأسماك، محققة إزالة أسيتيل بنسبة 92.7% مع الحفاظ على الوزن الجزيئي المناسب للتطبيقات الطبية.

2-4-2- الطريقة الفيزيائية لاستخلاص الشيتوزان:

تعد الطرق الفيزيائية لاستخلاص الشيتوزان بدائل واعدة للطرق الكيميائية التقليدية، خصوصاً في ظل التوجه نحو التقنيات الصديقة للبيئة والمستدامة. حيث تهدف هذه الطرق إلى تقليل استخدام الكواشف الكيميائية الشديدة والاعتماد على مؤثرات فيزيائية لتحفيز تفكك الروابط في الهيكل الخارجي للكائنات البحرية، لا سيما قشور الأسماك، مما يسهل استخلاص الكيتين وتحويله لاحقاً إلى شيتوزان. وتشير



مراجعة حديثة إلى أن هذه الطرق تسهم في إنتاج شيتوزان ذي خواص نقية وقابلة استخدام واسعة دون التأثير سلباً على البيئة (Ahmed et al., 2016).

ومن أبرز الطرق الفيزيائية:

2-4-2-1- المعالجة بالموجات فوق الصوتية (Ultrasound-Assisted) :(Extraction

تعتمد هذه الطريقة على تعريض مسحوق قشور الأسماك أو الكائنات البحرية الأخرى مثل الروبيان والسلطعون لترددات عالية (20-40 كيلوهرتز) داخل وسط مائي غالباً يحتوي على حمض عضوي ضعيف كحمض الخليك، تتولد فقاعات دقيقة تنفجر وتحدث ظاهرة "التجويف"، مما يؤدي إلى تفكك الروابط بين الكيتين والمكونات المصاحبة له كالبروتينات والأملاح المعدنية. وقد أظهرت دراسة حديثة أن هذه الطريقة ترفع من فعالية الاستخلاص وتقلل من التأثيرات البيئية السلبية أظهرت دراسة Navarro-Baez et al. (2022) أن استخدام المعالجة بالموجات فوق الصوتية في استخراج الشيتوزان من قشور الكائنات البحرية أدى إلى زيادة نسبة الحاصل بشكل ملحوظ مقارنة بالطرق التقليدية، حيث بلغ الحاصل حوالي 85% من المواد الأولية المستخدمة. كما لوحظ تحسن في جودة الشيتوزان المستخلص من حيث الوزن الجزيئي والدرجة العالية من نزع الأسيتيل، بالإضافة إلى تقليل الوقت اللازم للاستخلاص. هذه الطريقة ساهمت أيضاً في تقليل استخدام المواد الكيميائية الضارة والحد من المخلفات، مما يجعلها صديقة للبيئة وأكثر استدامة.

2-4-2-2- بالضغط الهيدروستاتيكي العالي (High Hydrostatic Pressure –) :(HHP

في هذه الطريقة، يعرض مسحوق قشور الأسماك أو القشريات لضغط مرتفع يتراوح بين 100 إلى 600 ميغا باسكال داخل وسط مائي عند درجات حرارة معتدلة. يؤدي الضغط العالي إلى تعطيل البنية



الخلوية وتسهيل تحرير الكيتين، الذي يحوّل لاحقاً إلى شيتوزان. ووفقاً لدراسة قام بها (Huang & Wang (2023) أوضحت دراسة أن استخدام الضغط الهيدروستاتيكي العالي (100-600 ميغا باسكال) لتحضير الشيتوزان من قشور الأسماك والقشريات أدى إلى زيادة في كفاءة الاستخلاص بنسبة وصلت إلى حوالي 78 % مقارنة بالطرق التقليدية. كما حافظت هذه الطريقة على الخصائص الفيزيائية والكيميائية للشيتوزان، مثل الوزن الجزيئي والدرجة العالية لنزع الأسيتيل، مما أدى إلى تحسين النشاط البيولوجي للمنتج النهائي. بالإضافة إلى ذلك، ساهم الضغط العالي في تقليل مدة الاستخلاص وتقليل استهلاك المواد الكيميائية المستخدمة، مما يعزز من الاستدامة البيئية للعملية.

ان هذه الطريقة تحسن من كفاءة الاستخلاص وتحافظ على الخواص الفيزيائية والكيميائية للشيتوزان، مع زيادة في النشاط البيولوجي.

2-4-3- الاستخلاص بطريقة المايكروويف (Microwave-Assisted Extraction):

تعد تقنية الاستخلاص بمساعدة المايكروويف (Microwave-Assisted Extraction) من الطرق الفيزيائية الحديثة والفعالة في استخلاص الشيتوزان من المصادر الحيوية مثل قشور القشريات، لما توفره من تقليل في الزمن والطاقة مقارنة بالطرق التقليدية. تعتمد هذه الطريقة على استخدام الطاقة الكهرومغناطيسية لتسريع التفاعلات الكيميائية المطلوبة في خطوات إزالة المعادن والبروتينات ومرحلة نزع الأسيتيل، دون الحاجة إلى تسخين خارجي مباشر، مما يؤدي إلى تحسين كفاءة الاستخلاص ورفع درجة النقاء.

قارن (Nguyen et. al. (2024) بين طريقة المايكروويف والطريقة التقليدية في استخلاص الشيتوزان من قشور الروبيان، حيث أظهر الاستخلاص المايكروويفي تفوقاً من حيث تقليل وقت العملية إلى 15 دقيقة فقط، مقارنة بأكثر من 4 ساعات في الطريقة التقليدية، وبلغت درجة نزع الأسيتيل حوالي 89%، مع تحسين في الصفات الفيزيائية والكيميائية للشيتوزان الناتج، مثل الوزن الجزيئي واللزوجة.



وأظهرت دراسة حديثة قام بها Huang et. al. (2023) أن استخدام المايكرويف بطاقة 875 واط ولمدة 30 دقيقة ساعد على إنتاج شيتوزان بدرجة نزع أسيتيل بلغت 86.7% وبوزن جزيئي منخفض، وهو ما يناسب بعض التطبيقات الصيدلانية والحيوية، وأكدت النتائج انخفاض الاستهلاك الطاقوي والكيميائي لهذه الطريقة مقارنة بالطرق التقليدية، مع الحفاظ على جودة المنتج.

2-4-3- الطريقة الحيوية لأستخلاص الشيتوزان:

تعد هذه التقنية متطورة وجديدة لأستخلاص الكايتين ويمكن اجرائها باستخدام الكائنات الدقيقة المحللة للبروتين أو الفطريات أو الأنزيمات النقية. يتميز الأستخلاص الأنزيمي بنوعية عالية وينتج كايتين بأوزان جزيئية أعلى الى جانب المزايا البيئية مقارنةً بالطريقة الكيميائية حيث يقلل استخدام الأنزيمات أيضاً من المخاطر المرتبطة بالكواشف الكيميائية؛ كما يمكن تقليل تكلفة انتاج الكايتين بالطريقة الحيوية من خلال تقليل تكلفة مصادر الكربون في بيئة التخمير (Nikhitha, 2023). وتشتمل هذه الطريقة على ثلاث خطوات:

2-4-3-1- إزالة البروتين (Deproteinization):

تستخدم عملية التخمير الحيوي عبر كائنات دقيقة مثل *Lactobacillus spp* و *Bacillus subtilis* التي تفرز إنزيمات تحلل البروتينات المرتبطة بالكايتين. حيث تزرع البكتيريا في وسط يحتوي على مسحوق قشور الأسماك وتحضن تحت ظروف معينة لضمان كفاءة التحلل. أظهرت نتائج Abdulmajid et. al. (2022) أن استخدام *Bacillus subtilis* أدى إلى إزالة نحو 82% من البروتين خلال خمسة أيام من التخمير، مع الحفاظ على جودة الكيتين المستخلص مقارنة بالطرق الكيميائية.

2-4-3-2- إزالة المعادن (Deminerlization)

تستخدم بكتريا حامض اللاكتيك مثل *Lactobacillus plantarum* لإنتاج حمض اللاكتيك أثناء التخمير، مما يساعد في إذابة كربونات الكالسيوم وتسهيل إزالة المعادن. وبينت Younes & Rinaudo



(2015) أن التخمر باستخدام *L. plantarum* أدى إلى إزالة أكثر من 90% من المعادن، وكانت النتائج قريبة من كفاءة حمض الهيدروكلوريك مع تأثير بيئي أقل.

2-4-3-3- نزع مجموعات الأسيتيل (Deacetylation):

عادة ما تعتمد هذه المرحلة على المعالجة القاعدية الخفيفة باستخدام NaOH بتركيز منخفض. هناك محاولات بحثية لاستغلال بعض الإنزيمات الفطرية لتسريع هذه الخطوة، إلا أن النتائج ما زالت بحاجة إلى تطوير. حسب (Suresh et al. (2023)، فإن استخدام NaOH بتركيز 5% أعطى درجة نزع أسيتيل وصلت إلى 75%، بينما استخدام الإنزيمات مثل *chitin deacetylase* المستخلصة من *Mucor rouxii* أدى إلى نسبة أقل بلغت حوالي 45%.

2-5- الخصائص الفيزيائية والكيميائية للشيتوزان:

يتكون الكيتين والشيتوزان من آلاف بقايا الجلوكوزامين المرتبطة ببعضها البعض بواسطة ارتباط β -(1-4) وذلك اعتماداً على درجة نزع الأسيتيل من الكيتين، يحتوي الشيتوزان على 15-50% من وحدات *N-acetyl-D-glucosamine*. نظراً لأن الكيتين والشيتوزان يحتويان على مجموعات أمينية ومحتوى نيتروجين يتراوح من 5% إلى 8%، فإنهما يظهران أدواراً بيولوجية مميزة (Singh et al., 2017).

الشيتوزان هو مشتق من الكيتين منزوع الأسيتيل N يتم إنتاجه عن طريق تغيير مجموعات الأسيتاميد إلى مجموعات أمينية أولية. إن الشيتوزان له قابلية أكثر للذوبان في الماء وتفاعلاً كيميائياً بالمقارنة بالكيتين، وذلك بسبب وجود مجموعات هيدروكسيل أولية وثنائية على كل وحدة متكررة بالإضافة إلى مجموعة الأمين على كل وحدة منزوعة الأسيتيل (Islam et al., 2016).

هذه المجموعات التفاعلية في الشيتوزان قابلة للتعديل الكيميائي بسهولة، مما يؤدي إلى تغيير خصائصه الميكانيكية والفيزيائية ويجعل الشيتوزان مادة مناسبة وجيدة لتطبيقات مختلفة. تظهر معظم



خصائص الشيتوزان من خلال خصائصه الفيزيائية والكيميائية، بما في ذلك الذوبان، ودرجة إزالة الأستيل، واللزوجة، والوزن الجزيئي.

2-5-1- الخصائص الفيزيائية:

2-5-1-1 الوزن الجزيئي (Molecular Weight):

يعد الوزن الجزيئي من العوامل الأساسية التي تؤثر بشكل مباشر على الخصائص الفيزيائية والكيميائية والحيوية للشيتوزان، حيث تختلف قيمته اعتماداً على مصدره، وطريقة استخلاصه، وشروط التحضير مثل التركيز القلوي ودرجة الحرارة (Abo Elsoud & El Kady, 2019). يصنف الشيتوزان عادة إلى ثلاثة أنواع حسب الوزن الجزيئي: منخفض، متوسط، وعال (Matica et al., 2019). يتمتع الشيتوزان عالي الوزن الجزيئي بارتفاع لزوجته وضعف ذوبانيته، مما يجعله غير مناسب للعديد من التطبيقات الصناعية الحساسة (Hu et al., 2018; Minh et al., 2020). وفي المقابل، يفضل استخدام الشيتوزان منخفض الوزن الجزيئي (>10 kDa) في التطبيقات الحيوية والصيدلانية وذلك لقابليته العالية للذوبان، وانخفاض لزوجته، وقدرته الكبيرة على التفاعل مع الأسطح الوظيفية، خصوصاً ضمن مدى pH يتراوح بين 3 و 8.5 (Choi et al., 2023). تشير الدراسات إلى أن ارتفاع الوزن الجزيئي يؤدي إلى زيادة اللزوجة وانخفاض الذوبانية، مما يحد من استخدام الشيتوزان في الأنظمة التي تتطلب تفاعلات سريعة وذوبانية عالية (Alemu et al., 2023). ومن الناحية الحيوية، يظهر الشيتوزان منخفض الوزن فعالية مضادة للبكتيريا أعلى لقدرته على اختراق جدران الخلايا والتفاعل مع مكوناتها الداخلية، مما يؤدي إلى تثبيط النمو. كما بينت دراسات أن هذا النوع يتميز بنشاط مضاد للأكسدة مرتفع في التركيزات المنخفضة (Alemu et al., 2023). أما الشيتوزان متوسط إلى عالي الوزن الجزيئي، فيستخدم في تصنيع الأغشية الطبية وتغليف الأدوية (مثل أغشية الجنتاميسين)، حيث يوفر متانة ميكانيكية ومقاومة بكتيرية، لكنه يعاني من محدودية الذوبان وارتفاع اللزوجة، مما يعيق استخدامه في



التطبيقات الحيوية السريعة (Alemu et al., 2023). وقد أظهرت نتائج هذه الدراسة أن الوزن الجزيئي للشيتوزان المستخلص بلغ 226.1 kDa، وتم تحديده باستخدام طريقة اللزوجة، والتي تعد من أكثر الطرق بساطة ودقة في هذا المجال. يشير هذا الوزن إلى حفاظ المادة على تكامل سلاسلها البوليمرية بفضل شروط الاستخلاص المحكمة، مما يجعلها ملائمة للتطبيقات التي تتطلب شيتوزان عالي الجودة (Iber et al., 2022; Kasaai et al., 2000).

2-1-5-2 - اللزوجة (Viscosity):

تعد اللزوجة من الخصائص الفيزيائية الأساسية التي تؤثر على تطبيقات الشيتوزان، خاصة في المجالات البيئية والصيدلانية. وتعتمد لزوجة الشيتوزان بشكل رئيس على عدة عوامل مترابطة، منها الوزن الجزيئي، ودرجة نزع الأسيتيل (Degree of Deacetylation – DD)، وحجم الجسيمات، بالإضافة إلى درجة الحرارة، وتركيز البوليمر، ومدة التخزين.

فمن المعروف أن زيادة درجة نزع الأسيتيل تؤدي إلى ارتفاع عدد مجموعات الأمين الحرة ذات الشحنة الموجبة، مما يعزز التنافر الكهروستاتيكي بين السلاسل البوليمرية، وبالتالي تتكون شبكة أكثر لزوجة (Aranaz et al., 2021). وفي الوقت نفسه، فإن الوزن الجزيئي المرتفع للشيتوزان يساهم أيضاً في زيادة اللزوجة، نتيجة لزيادة تعقيد السلسلة البوليمرية وقدرتها على الارتباط المائي (Zid et al., 2023).

وأشارت دراسات عديدة إلى أن لزوجة الشيتوزان تتناقص مع ارتفاع درجة الحرارة ودرجة الحموضة (Kasaai et al., 2000) pH. حيث أن التغيير في هذه العوامل يؤدي إلى تقليل التفاعلات بين السلاسل، ويجعل البوليمر في شكل أكثر تحرراً، مما يقلل من لزوجته. كما بين Chattopadhyay and Inamdar (2010) أن الشيتوزان النانوي يظهر انخفاضاً ملحوظاً في اللزوجة مقارنة بالشيتوزان التقليدي، بنسبة تصل إلى 30% عند نفس التركيز، ويعزى ذلك لصغر حجم الجسيمات الذي يقلل من التشابك بين



السلاسل. كذلك، أظهرت النتائج أن مدة التخزين تؤثر سلباً على اللزوجة، حيث لوحظ انخفاض بنسبة 10% بعد 24 ساعة في الشيتوزان العادي، بينما بلغ الانخفاض 17% في حالة النانو شيتوزان.

من جهة أخرى، فإن طريقة التحضير والمصدر البيولوجي للمادة الخام يلعبان دوراً كبيراً في تحديد لزوجة الشيتوزان، نظراً لاختلاف التركيب البنيوي والكيميائي باختلاف المصدر (Benomar et al., 2023).

2-5-1-3- درجة إزالة الأسيتيل (Degree of Deacetylation – DD):

تعد درجة إزالة الأسيتيل (DD) من العوامل البنيوية الأساسية التي تتحكم في خصائص الشيتوزان الفيزيائية والكيميائية، وتؤثر بصورة مباشرة على نشاطه الحيوي وتطبيقاته. وتعكس هذه الدرجة النسبة المولية لوحدات D-glucosamine إلى مجموع الوحدات السكرية، حيث يؤدي ارتفاع DD إلى زيادة عدد المجموعات الأمينية الحرة ذات الشحنة الموجبة، مما يمنح الشيتوزان طابعه الكاتيوني في الأوساط الحمضية ويعزز من قابليته للذوبان والتفاعل (Zid et al., 2023).

بين الباحث Zid وزملاؤه (2023) أن الشيتوزان المستخلص من فطر *Agaricus bisporus* أظهر درجة إزالة أسيتيل بلغت 86% باستخدام تحليل FTIR، مما انعكس إيجاباً على خصائصه الوظيفية. حيث ازدادت قابلية الذوبان في الأوساط الحمضية، وارتفعت اللزوجة النسبية، وهو ما يؤكد العلاقة الطردية بين DD والخصائص الحيوية للشيتوزان.

كذلك أشار Benomar وزملاؤه (2023) إلى أن درجة إزالة الأسيتيل تتأثر بالمصدر الحيوي للشيتوزان. وقد بينت نتائج دراستهم أن العينات ذات DD المرتفعة أظهرت فعالية أكبر في الامتزاز الحيوي لصبغة AzO، بالإضافة إلى تعزيز النشاط المضاد للبكتيريا، مما يعكس تأثير DD المباشر في تحديد كفاءة الشيتوزان في التطبيقات البيئية.



وتعد درجة إزالة الأسيتيل أيضا معيارا لفصل الكيتين عن الشيتوزان، إذ تعتبر القيمة التي تتجاوز 50% مؤشرا على تحول الكيتين إلى شيتوزان قابل للذوبان والنشاط الحيوي. كما يمكن تحديد هذه الدرجة باستخدام تقنيات تحليلية مختلفة، من أبرزها FTIR، وNMR، والتحليل الطيفي بالأشعة فوق البنفسجية (Zid et al., 2023).

2-5-1-4- الخصائص الحرارية:

يتمتع الشيتوزان بعدد من السمات المهمة والمميزة له بما يتعلق بخصائصه الحرارية من ضمنها:

الاستقرار الحراري : للشيتوزان استقرار حراري مناسب حيث ان درجة حرارة تحلله تكون عادة بين الـ 200 و 300 درجة مئوية وأن اختلاف درجة حرارة التحلل للشيتوزان بسبب عوامل عدة مثل : الوزن الجزيئي ودرجة نزع الاستيل .

درجة حرارة انتقال الزجاج Tg : أحد السمات الهامة للشيتوزان هي درجة حرارة انتقال الزجاج وهي درجة الحرارة التي يحدث عندها انتقال الشيتوزان من الحالة الصلبة إلى حالة أكثر ليونة وأكثر مرونة وتتأثر هذه الدرجة بعوامل منها درجة نزع الاستيل والوزن الجزيئي ووجود الملدنات تظهر درجة الـ Tg للشيتوزان بحدود 50 إلى 100 درجة مئوية. (D.Bajer&H.Kaczmarek, 2022)

نقطة الانصهار: لا يتمتع الشيتوزان بنقطة انصهار محددة جيدا كما تمتلك بعض المواد البلورية لكن عند التسخين يخضع لتفكك وتحلل تدريجي، على الرغم من ذلك يمكن مزج الشيتوزان أو تعديله بمواد أخرى لتغيير سلوكه الحراري وإنشاء مواد ذات درجات حرارة انصهار أو تحلل محددة

الموصلية الحرارية: يمتلك الشيتوزان موصلية حرارية منخفضة نسبياً وهذا جعله مناسباً للتطبيقات التي يكون فيها العزل الحراري مطلوباً وهذه الخاصية من الممكن أن تكون مفيدة في العديد من المجالات مثل مواد التعبئة والتغليف أو ضمادات الجروح حيث يكون العزل الحراري وإدارة الرطوبة مهمين. (Dongre, 2019)



التمدد الحراري: قد يكون للشيتوزان عادة خاصية التمدد الحراري مما يعني ذلك انه يتمدد عند تسخينه وينكمش عند تبريده ويعود حجم التمدد الحراري على عينة الشيتوزان المحددة وتكوينها. (Dongre, 2019).

2-5-2- الخصائص الكيميائية:

2-5-2-1 الذوبان:

الشيتوزان قابل للذوبان في مذيب حمضي، بينما لا يظهر قابلية للذوبان في المذيبات المحايدة أو القلوية. وعلى الرغم من أن الكيتين غير قابل للذوبان في معظم المذيبات، فإن عملية إزالة الأسيتيل منه تنتج شيتوزان يحتوي على مجموعات أمينية أولية ذات قيمة pK_a تقدر بحوالي 6.5، مما يسمح لها بالتبروتن في الوسط الحمضي لتصبح موجبة الشحنة، وبالتالي يصبح البوليمر قابلاً للذوبان. أما عند ارتفاع الرقم الهيدروجيني إلى 6 أو أكثر، فإن هذه المجموعات تفقد شحنتها وتتحول السلاسل إلى صورة غير قابلة للذوبان (Zargar et al., 2015).

تعتمد قابلية الذوبان أيضاً على عدة عوامل مثل الوزن الجزيئي ودرجة نزع الأسيتيل وبلورية البوليمر ودرجة الحرارة. حيث أوضحت Wang et al. (2024) أن خفض الوزن الجزيئي إلى أقل من 100 كيلودالتون يؤدي إلى تفكك الروابط الهيدروجينية وتقليل التبلور الداخلي، مما يعزز من ذوبانية الشيتوزان في الأوساط الحمضية. كما بينت Zhang et al. (2024)، باستخدام تقنية Single-Molecule Force Spectroscopy، أن التبروتن عند pH منخفض يؤدي إلى تشكيل جسور ماء (hydrophilic water bridges) بين السلاسل البوليمرية، مما يزيد من مرونة السلاسل وبالتالي يحسن الذوبان.



من جهة أخرى، أشارت دراسة منشورة في (2023) ScienceDirect إلى أن درجة الحرارة تؤثر بشكل ملحوظ على الذوبانية، إذ وجد أن الذوبان يزداد عند درجات حرارة معتدلة، بينما تؤدي درجات الحرارة المرتفعة (أعلى من 50°C) إلى إعادة ترتيب الهيكل البلوري للشيتوزان، مما يقلل من ذوبانه.

وفي إطار تحسين الذوبانية بطرق كيميائية، قامت دراسة لـ (2024) ACS Omega بتعديل الشيتوزان من خلال ربطه بأحماض دهنية مثل حمض الأوليك واللينوليك، مما ساهم في تحسين ذوبانيته في الماء وزيادة فعاليته الحيوية، خصوصا في التطبيقات الصيدلانية.

وأخيرا، وفي إطار الاتجاه نحو المعالجات الفيزيائية الصديقة للبيئة، أظهرت دراسة حديثة قام بها Li et al. (2025) أن استخدام تقنية الضغط الهيدروستاتيكي العالي (High Hydrostatic Pressure - HHP) حسن من ذوبانية الشيتوزان في الوسط الحمضي دون الحاجة إلى تسخين أو استخدام مذيبات عضوية، ما يعد خيارا واعدًا في التطبيقات الغذائية والدوائية المستدامة.

2-5-2 -2 سعة ربط الماء والدهون:

تعد سعة ربط الماء (Water Binding Capacity - WBC) وسعة ربط الدهون (Fat Binding Capacity - FBC) من الخصائص الوظيفية الحيوية للكيتين والشيتوزان، ويقاسان تجريبياً عبر طرائق مختبرية معدلة تعتمد على وزن العينة بعد تعرضها للماء أو الزيت ثم الطرد المركزي. تختلف هذه القيم تبعاً للمصدر والخصائص التركيبية، حيث تتراوح قيمة WBC للكيتين بين 381 و673%، بينما يبلغ نطاقها للشيتوزان بين 458 و805%، مما يعكس تفوق الشيتوزان في احتجاز الماء مقارنة بالكيتين، وهو أمر ينسب إلى غناه بالمجموعات الأمينية الحرة وارتفاع درجة إزالة الأسيتيل، فضلاً عن اختلاف محتوى الأملاح والبروتينات فيما يتعلق بسعة ربط الدهون، فقد سجل الكيتين قيماً تتراوح بين 316 و320%، بينما سجل الشيتوزان نطاقاً أوسع وصل إلى 314-535%، مما يدل على قدرته الأعلى على التفاعل مع المركبات الدهنية (Thomas et al., 2020). يأتي هذا في سياق تأكيدات



دراسة حديثة أجريت على شيتوزان مستخلص من مصادر حشرية متنوعة (*Blaps lethifera*, *Pimelia*) و *Musca domestica*، *fernandezlopezi*)، حيث تم قياس WBC و FBC باستخدام طريقة معدلة وسجلت قيم تراوحت بين 517 و 724 % للربط المائي، كما بلغ الربط الدهني مستويات مرتفعة تتماشى مع نطاق الشيتوزان التجاري، ما يشير إلى تأثير مصدر المادة ودرجة إزالة الأستيل على هذه الخصائص (Springer, 2023).

2-5-2-3- درجة حموضة الشيتوزان:

تشير الدراسات إلى أن المحاليل المخففة من الشيتوزان تتميز بدرجة حموضة تقل عن 6.0، ويعزى هذا السلوك إلى وجود مجموعات الأمين الأولية الحرة (NH_2^-) على طول السلسلة البوليمرية. تمتلك هذه المجموعات قيمة pKa تقارب 6.3، مما يجعل استجابتها للرقم الهيدروجيني ذات تأثير مباشر على خصائص البوليمر. فعند انخفاض الرقم الهيدروجيني، تكتسب مجموعات الأمين بروتونات (H^+)، مما يؤدي إلى تحولها إلى الشكل المشحون إيجابياً (NH_3^+)، وهو ما يكسب الشيتوزان طبيعة كاتيونية متعددة ويجعله قابلاً للذوبان في الماء.

في المقابل، عند ارتفاع الرقم الهيدروجيني إلى ما يزيد عن 6.0، تفقد مجموعات الأمين بروتوناتها وتعود إلى شكلها غير المشحون، ما يؤدي إلى انخفاض ذوبانية الشيتوزان في الماء. ومن الجدير بالذكر أن قيمة pKa للشيتوزان ليست ثابتة، بل تتأثر بدرجة الأستلة وطريقة استخلاصه. كما أن قدرة الشيتوزان على التفاعل مع البوليمرات الأيونية لتكوين شبكات هلامية مترابطة تعزز من إمكاناته في التطبيقات الدوائية، لا سيما في نظم الإطلاق الدوائي الموجه (Aranaz et al., 2021)



2-5-4- تفاعلات الشيتوزان:

يعد الشيتوزان بوليمرا خطيا يتكون من سلسلة تحتوي على مجموعات وظيفية فعالة، أبرزها مجموعة الأمين (NH_2) ومجموعة الهيدروكسيل ($-OH$)، والتي تمثل مواقع تفاعل رئيسية على العمود الفقري للجزيء. وتسهم هذه المجموعات، لاسيما مجموعة الأمين نظرا لما تحويه من بروتونات، في تعزيز النشاط التفاعلي للشيتوزان. وتظهر السلاسل البوليمرية المحتوية على نسبة أعلى من مجموعات الأمين قدرة تفاعلية أكبر، مما يمنح الشيتوزان كفاءة عالية في الارتباط بأيونات المعادن الثقيلة، إلى جانب قابليته لتكوين معقدات مع أيونات المعادن الانتقالية. وقد أثبتت هذه الخصائص فاعلية الشيتوزان في التطبيقات البيئية، لاسيما في مجالات معالجة المياه وتنقية الهواء (Thomas et al., 2020)

2-6- تطبيقات الشيتوزان:

يعتمد النشاط المضاد للميكروبات للشيتوزان على مجموعة من العوامل الداخلية، كدرجة إزالة الأسيتيل (DD) والوزن الجزيئي (Mw)، والعوامل الخارجية مثل الرقم الهيدروجيني، نوع الكائنات الحية الدقيقة، ووجود الكاتيونات المعدنية أو حمض الشيتوزان. وقد اقترح Al-An & Hardwieg لأول مرة إمكانية استخدامه كمضاد واسع الطيف للبكتيريا، مشيرين إلى إمكاناته التجارية الواسعة. وأكدت الدراسات الحديثة نجاح الشيتوزان في تثبيط نمو العديد من أنواع البكتيريا (Gram-positive) و (Gram-negative) والفطريات الخيطية والخمائر، مع سمية منخفضة تجاه خلايا الثدييات، ما يجعله خيارا واعدا في التطبيقات الحيوية. (Aderibigbe & Naki, 2024).

إلى جانب نشاطه المضاد للميكروبات، يمتلك الشيتوزان خصائص مضادة للأكسدة، إذ يملك القدرة على تثبيط أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS)، مما يحد من أكسدة الدهون والضرر التأكسدي في الأنظمة الحيوية. تشير الأبحاث إلى أن آلية عمله المضاد للأكسدة تشمل تكوين مجمعات استخلابية مع أيونات



المعادن الضارة، بالإضافة إلى امتصاص الجذور الحرة وتبادل الأيونات. (Yang et al., 2024). وقد دعمت هذا التوصيف مراجعة شاملة نشرت في Carbohydrate Polymers عام 2024، والتي أرخت الاستخدام المتكامل للشيتوزان في هياكل الهلام (hydrogels) متعددة الوظائف؛ حيث وجد أنها تعمل على توفير بيئة مناسبة للتعقيم) باستخدام نشاطه المضاد للميكروبات(، وتحفيز تمايز الخلايا، وتنشيط الإجهاد التأكسدي (ROS) في مواقع الجروح المزمنة، وقد أشارت الدراسة إلى أن تركيب الخليط والتركيب الجزيئي للشيتوزان، بما في ذلك معدل التثيث والتعديل الكيميائي، يؤثر بشكل مباشر في فعاليته الحيوية(Tan et al., 2024).

2-6-1 الطب والصيدة :

لقد اتاحت الخصائص الحيوية وتوافقه الحيوي المميزة للشيتوزان بالعديد من التطبيقات الصيدلانية والطبية الحيوية والسريرية. (Bellouti & Hadj Djilani, 2018). يستخدم الشيتوزان كمضاد للميكروبات وهو فعال لجميع أنواع الضمادات، الجلد الصناعي، ضمادات القرنية وفي جراحة الأسنان. وكذلك يستخدم في الأعضاء الاصطناعية مثل الكبد والعظام والجلد يساعد الشيتوزان على خفض مستويات الكولسترول وقد اضحى رقم واحد لمنتجات التخسيس الطبيعية). تامة وآخرون، (2021) قام Zhao ورفاقه (2023) باستخدام ضمادات شيتوزان هيدروجيل لتعزيز التئام الجروح المزمنة وتقليل الالتهابات، مع تحسين نمو الخلايا الجلدية ورفع قدرة التجديد النسيجي. بالإضافة إلى ذلك، تناولت مراجعة شاملة في مجلة International Journal of Pharmaceutics (2023) الاستخدامات المتنوعة للشيتوزان كمادة حاملة في تحضير أنظمة الإطلاق المستهدف للأدوية المضادة للسرطان والالتهابات، مؤكدة دوره في تحسين الذوبانية والاستقرار الدوائي. (Kumar et al., 2023). من ناحية أخرى، تم دراسة استخدام الشيتوزان في تصنيع الأقراص الصيدلانية والجيلاتين



الدوائي، حيث أظهرت دراسات عديدة كفاءته كمادة رابطة ومحسنة لخصائص الذوبان، مما يساهم في تحسين التوافر البيولوجي للأدوية (Singh & Verma, 2024).

2-6-2- البيئة وتنقية المياه:

يستخدم الشيتوزان لترشيح المياه وتخليصها من المركبات السامة كالرصاص والنحاس والكاديميوم عن طريق تكوين معقدات بين المجموعة الأمينية وأيونات المعادن الثقيلة، كما يعد مادة امتصاص حيوية للنيوكليوتيدات المشعة في المحاليل المائية ضمن البيئة الحمضية. من ناحية أخرى، هنالك محاولات تمكن الباحثون خلالها من استعمال الشيتوزان لإنتاج أكياس بلاستيكية قابلة للتحلل الحيوي صديقة للبيئة. (كرد علي، 2021):

بالإضافة إلى ذلك، تناولت مراجعة في مجلة *Molecules* (2024) دمج الشيتوزان مع مواد كربونية ومغناطيسية مثل الجرافين وأكسيد السيليكا والكربون المنشط، حيث أظهرت هذه التركيبات فعالية عالية في إزالة المعادن الثقيلة، الأصباغ، المبيدات، والأدوية من المياه، مع إمكانية إعادة استخدام المواد الماصة (Kim et al., 2024) ومن الجانب الاقتصادي والبيئي، بينت دراسة منشورة في *Current World Environment* (2025) أن الشيتوزان يمكن إنتاجه من مخلفات بحرية، مما يجعله مادة منخفضة التكلفة وصديقة للبيئة تستخدم في تنقية المياه السطحية والصرف الصحي، ويقدم حلاً مستداماً وفعالاً في المناطق التي تفتقر إلى بنية تحتية متطورة. (Patel & Singh, 2025).

2-6-3 عامل مضاد للبكتريا

من المشاكل الصحية العامة هي مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية، وبالتالي فإن إيجاد بديل للمضادات الحيوية أمر مهم. أظهر الشيتوزان ومشتقاته فعالية مضادة للبكتريا تجاه مجموعة واسعة من الكائنات الحية الدقيقة، بما في ذلك البكتيريا والفطريات الخيطية والخميرة. (Hasnain et al., 2022). لم يتم فهم



الآلية الدقيقة للنشاط المضاد للبكتيريا بشكل كامل بعد. وبالرغم من ذلك، تم اقتراح فرضيات مختلفة، حيث تعتمد غالبية هذه الآليات على الميزة المتعددة الشحنات الموجبة للشيتوزان. وان أول الآليات المقترحة هي أن الشيتوزان يسبب نفاذية خلوية ويحفز تسرب المكونات داخل الخلايا نتيجة لتفاعله مع المكونات الأيونية لغشاء الخلية، مما يؤدي في النهاية إلى موت الخلية (Hosseinnejad & Jafari, 2016). آلية أخرى محتملة هي اختراق الشيتوزان عبر غشاء الخلية متبوعا بالارتباط بالحمض النووي، مما يثبط تكرار الحمض النووي ويؤدي في النهاية إلى موت الخلية. (Kravanja et al., 2019). على ما يبدو أن الشيتوزان له أيضا تأثير مثبت للنمو لأنه يتمتع بقدرة عالية على تخليب العديد من أيونات المعادن، مثل Ni ، Zn ، Co ، Fe و Cu عندما تتجاوز قيمة الرقم الهيدروجيني قيمة pKa الخاصة به . ونتيجة لذلك، يتم تثبيط نمو الميكروبات. (Matica et al., 2019). يمكن للشيتوزان أيضا تثبيط نمو الميكروبات عن طريق تكوين بوليمر كثيف على سطح الخلية ومنع امتصاص العناصر الغذائية والأكسجين .

لقد اتضح أن الشيتوزان يتمتع بمجموعة واسعة من الفعالية المثبطة ضد العديد من البكتيريا إيجابية الجرام والبكتيريا سلبية الجرام و . تحتوي البكتيريا سلبية الجرام على ليوبولي ساكاريد في أغشيتها الخارجية، مما يمنحها خصائص سطحية محبة للماء. يعمل الغشاء الخارجي كدفاع ضد السموم والجزيئات الكبيرة الكارهة للماء . من ناحية أخرى، يتكون سطح البكتيريا إيجابية الجرام من بيتيدوجليكان وحمض التيكويك، وهي ضرورية لنشاط العديد من الإنزيمات المرتبطة بالغشاء. تختلف طريقة النشاط المضاد للبكتيريا بين البكتيريا إيجابية الجرام وسلبية الجرام بسبب التغيرات في بنية الخلية.

(Li et al., 2020) يعتمد نشاط الشيتوزان المضاد للميكروبات بشكل كبير على درجة إزالة الأسيتيل والوزن الجزيئي ولزوجة البوليمر وتركيز البوليمر 2 (Kravanja et al., 2019). أظهرت العديد من الدراسات ان هناك علاقة وثيقة بين الوزن الجزيئي والفعالية الحيوية للشيتوزان حيث



ذكر Jaber, et.al. (2022) ان معالجة البطاطا المصابة بفيروس (PVX) X بالمعاملة بالشيتوزان ذات الوزن الجزيئي 120 كيلو دالتون أعطى نتائج أفضل كمضاد للفيروس مقارنة مع استخدام الشيتوزان منخفض الوزن الجزيئي 3-63 كيلو دالتون .

2-6-4- لتطبيقات الغذائية:

أن النشاط البيولوجي للشيتوزان بالإضافة الى سلامته الصحية يتيح تطبيقه على نطاق واسع في صناعة الأغذية حيث يسمح نشاطه المضاد للأكسدة والمضاد للميكروبات بأستخدامه لزيادة مدة صلاحية الأغذية كما أن خصائصه الأستحلابية الممتازة تتيح له أستبدال المواد الخافضة للتوتر السطحي الأسطناعية (Kabanov & Novinyuk, 2020)، وذكر (Jimenez-Gomez & Cecilia, 2020) ان اضافة كميات قليلة من الشيتوزان الى الأغذية كمواد مستحلبة أو مثخنة أو مروقة للعصائر يحسن من الهضم ويحافظ على التوازن الميكروبي في الأمعاء. من أهم العوامل التي شجعت على استخدام الشيتوزان في صناعة الأغذية هي قدرته على تشكيل الأغشية مما يتيح انتاج عبوات ذكية وطويلة الأمد لحفظ المنتجات الغذائية الطازجة ليحل محل العبوات البلاستيكية مع الحفاظ على جودة المنتجات الغذائية، بل وتحسينها (Bertrand et.al.,2024). كما قام Abdul Mottalib (2024) et al بتحضير مواد تغليف جديدة بأستخدام خليط من بلورات نانوية من الشيتوزان المستخلص من قشور أسماك *Tenualosa Ilisha* مع الجيلاتين وتميزت هذه الأغشية بجميع المميزات الأساسية المرغوبة في مواد التعبئة والتغليف مثل التوافق الحيوي والشفافية



ونعومة الاسطح وقابلية التحلل البيولوجي مما يجعلها مناسبة للاستخدام كمواد تغليف في مختلف الصناعات.

2-6-5 التطبيقات الزراعية :

أظهرت الدراسات الحديثة فعالية الشيتوزان كمركب حيوي في تعزيز إنبات البذور وتحسين نمو النباتات تحت ظروف الإجهاد البيئي، خاصةً الإجهاد الملحي. تشير الأبحاث إلى أن نقع بذور النباتات في محاليل شيتوزان يمكن أن يحسن معدل الإنبات، طول الجذور، وسرعة النمو، مما يساهم في زيادة قدرة النباتات على تحمل الملوحة .

على سبيل المثال، أظهرت دراسة Şavkan وÇandar (2024) أن نقع بذور البنجر (*Beta vulgaris*) في محلول شيتوزان بتركيز 300 ppm لمدة ساعة أدى إلى تحسين واضح في معدل وسرعة الإنبات تحت تأثير 100 mM ملح (NaCl)، بينما كان تركيز 200 ppm الأكثر فعالية في تحسين طول الجذور والسيقان، مما يدل على قدرة الشيتوزان على الحد من التأثير السلبي للملوحة على النمو الأولي للنباتات. (Şavkan & Çandar, 2024):

وأظهرت دراسة أخرى أن استخدام محلول شيتوزان بتركيز 0.04% في بذور الكيرلا (*Momordica charantia*) ساهم في تقليل تأثير الإجهاد الملحي بنسبة تصل إلى 37.1%، مما يحسن من معدل الإنبات ونمو الجذور والسوق تحت ظروف ملوحة. (Gupta & Verma, 2024). بالإضافة إلى ذلك، استعرضت دراسة Kumar et al. (2024) دور الشيتوزان والجزيئات النانوية للشيتوزان كعوامل تمهيدية في التخفيف من الإجهاد البيئي، مع التركيز على الإجهاد الملحي. وأشارت إلى أن الشيتوزان والجزيئات النانوية تحسن من معدل الإنبات وصحة الشتلات بشكل كبير، مما يجعلها فعالة في تعزيز إنبات البذور تحت ظروف الإجهاد الملحي. (Kumar, Patel & Singh, 2024). تظهر



هذه الدراسات أن الشيتوزان يعتبر مادة فعالة لتحسين جودة الزراعة في البيئات المالحة من خلال تعزيز قدرة النباتات على إنبات البذور والنمو تحت الإجهادات الملحية، مما يجعله خيارا مستداما ومفيدا في الزراعة الحيوية الحديثة.

2-6-6 مستحضرات التجميل:

يعتبر الشيتوزان هو البوليمر الكاتيوني الطبيعي الوحيد الذي يصبح لزجا عند تحييده بالحامض الى جانب خصائصه الأخرى كل هذه العوامل شجعت على استخدامه في الكريمات واللوشن وطلاء الأظافر . .
(Jiménez-Gómez & Cecilia, 2020) يشكل الشيتوزان طبقة واقية على سطح الجلد قادرة على تثبيت المكونات النشطة الأخرى للبشرة لذلك يستخدم كعامل مرطب. ويستخدم أيضا في إنتاج الشامبو والبلسم ويدخل في تركيبة معجون الأسنان، ولديه أيضا القدرة على الاحتفاظ بالرطوبة وتليين الشعر والجلد.

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

(Materials and Methods)



3 - المواد وطرائق العمل *Materials and methods*:

3 - 1 المواد والأجهزة المستعملة:

3 - 1 - 1 الأجهزة المستخدمة:

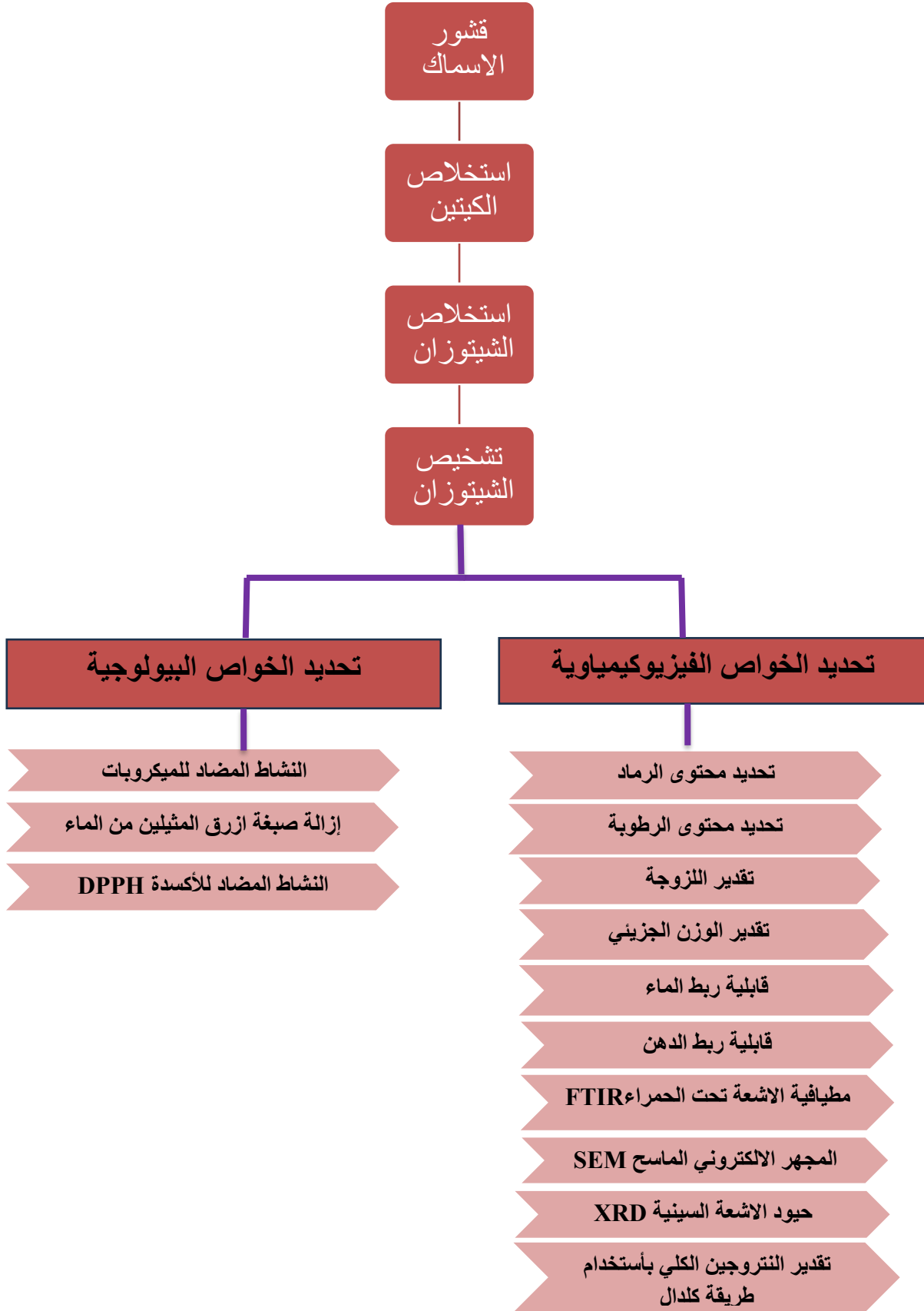
ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة	المنشأ
1	الميزان الحساس Sensitive Balance	Kern	المانيا
2	جهاز التقطير Water distillatory	GFR	المانيا
3	المحرك المغناطيسي Magnetic Stirrer	Corning	المانيا
4	جهاز الطرد المركزي Centrifuge	Hermle	المانيا
5	الفرن الكهربائي Electric Oven	Memert	المانيا
6	الحاضنة Incubator	Binder	المانيا
7	المؤصدة Autoclave	Hirayama	اليابان
8	فايتك Vitek Compact System2	Bio Mreyeux	فرنسا
9	كابينة زرع Inoculation Hood	Lab Tech	فرنسا
10	اطباق بتري Petri Dishes	Bio Zek medical	هولندا
11	انابيب اختبار Test Tube	ALS	كندا
12	الثاقب الفليني Cork borer	Brand-W	المانيا
13	الماصة الالكترونية Electronic Pipette	Raini	الولايات المتحدة الامريكية
14	ابندروف Epindroff	Bio neer	كوريا
15	مقياس الرقم الهيدروجيني PH meter	Oaktan	سنغافورا
16	مازج Vortex	Bionex	كوريا
17	جهاز حيود الاشعة السينية X-ray diffraction	Phillips	هولندا
18	المجهر الالكتروني الماسح Scanning electron microscopy	Phywe	سويسرا
19	مطياف الاشعة تحت الحمراء Infrared media swap (FTIR)	Shimadzu	اليابان



ايطاليا	ORMA s.r.l.apparecchi scientifici	Muffle Furnace فرن الترميد	20
بريطانيا	Maufacturer	UV/Vis مطياف ضوئي مرئي وفوق بنفسجي Spectrophotometer	21
البرازيل	Fanem	Vortex Mixre جهاز الرج الدوار	22
الصين	Koehler	Ostwald viscometer مقياس اللزوجة الشعري	23

3-1-2- المواد الكيميائية المستخدمة:

الشركة المجهزة	المادة الكيميائية	التسلسل
USA	Mueller Hinton ager وسط مولر هنتون	1
SRL	Sodium Hydroxid هيدروكسيد الصوديوم	2
BASF	Methylene Blue الميثيلين الازرق	3
Oxychem	Hydrochloric Acid حمض الهيدروكلوريك	4
Celanese	Acetic Acid حمض الاسيتيك	5
Glemhan life Sciences	Chitosan شيتوزان	6
Sigma	DMSO	7
Sigma	BHT	8
Sigma	DPPH	9
HiMedia Laboratories	Nutrient Broth المرق المغذي	10
Sigma	KBr بروميد البوتاسيوم	11
Sigma	Methanol ميثانول	12



مخطط العمل الرئيسي لاستخلاص وتوصيف الشيتوزان

2-3 المواد الأولية Raw Materials :

جمعت قشور نوعين من الأسماك المحلية الأولى أسماك الصبور (*Tenualosa ilisha*) من سوق البصرة في محافظة البصرة والنوع الثاني أسماك السمطي (*Cyprinus carpio*) من سوق المجر الكبير في محافظة ميسان كنواتج عرضية لعملية تنظيف الأسماك، غسلت القشور بماء الحنفية وجففت في الفرن على درجة حرارة 60°C وطحنت إلى مسحوق لغرض استخلاص الشيتوزان.



شكل (3_1)

قشور الأسماك (A) الصبور (B) السمطي.

3-3-3 خطوات تحضير الشيتوزان من الكيتين:

1-3-3-1 استخلاص الكيتين Extraction of Chitin:

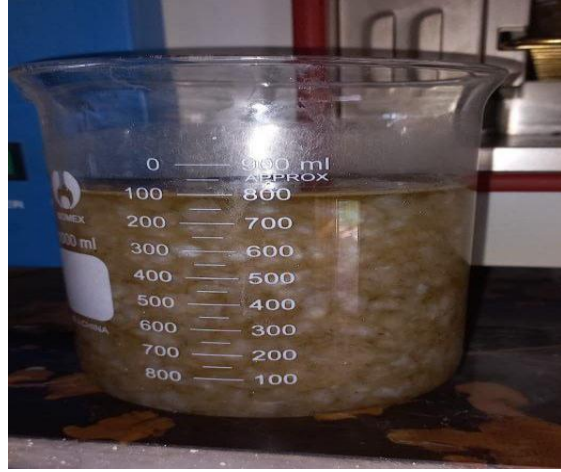
تم استخلاص الكيتين من مسحوق قشور الأسماك كيميائياً وعلى مرحلتين وحسب الطريقة التي ذكرها (Aichayawanich & Saengprapaitip, 2019) مع بعض التحويلات.

1-3-3-1 إزالة البروتين Deproteinization:

نقع مسحوق قشور الأسماك (الصبور و السمطي) كلاً على حده في محلول NaOH بتركيز 2 مولار وبنسبة 8:1 (وزن/حجم) لمدة 5 ساعات على درجة حرارة 40°C ثم التخلص من الراشح وغسل المتبقي عدة مرات بالماء المقطر لحين الوصول لمرحلة التعادل عند الـ اس الهيدروجيني 7 .



B



A

شكل (2-3): إزالة البروتين من قشور أسماك (A) الصبور (B) السمتي

2-1-3-3 إزالة المعادن Demineralization:

وضع الناتج من المرحلة الأولى في محلول HCL بتركيز 2 مولار حجم / حجم ونسبة 1: 8 وزن / حجم لمدة 5 ساعات عند درجة حرارة 40°C وتم التخلص من الراشح وغسل الخليط المتبقي بالماء المقطر عدة مرات لإزالة الحامض وجففت العينة على درجة حرارة 50°C لمدة 10 ساعات لإنتاج الكيتين.

B

A

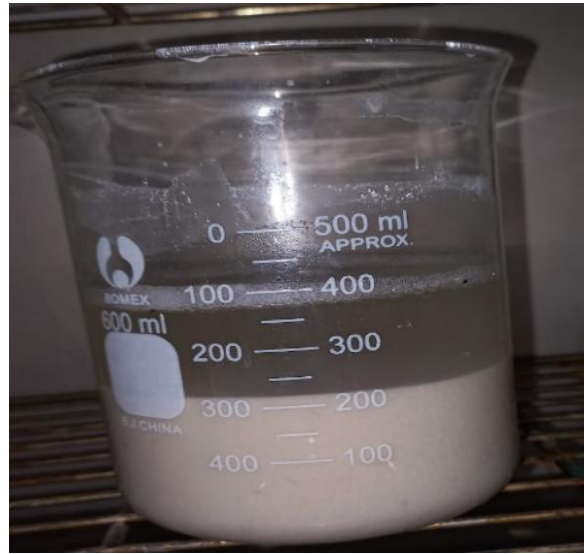


شكل (3-3): إزالة المعادن من قشور أسماك (A) الصبور (B) السمتي.

2-3-3 إنتاج الشيتوزان من الكايتين (إزالة مجاميع الاستيل) Deacetylation:



حضر الشيتوزان من الكيتين الناتج عن طريق ازالة مجاميع الاستيل ا وحسب الطريقة التي ذكرها (Aichayawanich & Saengprapaitip, 2019) مع بعض التحويرات وذلك بالمعاملة القاعدية للكيتين باستعمال NaOH بتركيز 2 مولار وزن /حجم وبنسبة 8:1 وزن/ حجم عند درجة حرارة 55C° ولمدة 5 ساعات غسل الناتج عدة مرات بالماء المقطر لحين الوصول إلى التعادل pH7 ثم جفف على درجة حرارة 50C° لمدة 10 ساعات لإنتاج الشيتوزان.



B

A

شكل (3-4): ازالة الأسئلة من الكيتين المستخلص من قشور أسماك (A) الصبور (B) السمتي.

4-3 تقدير نسبة الحاصل (Yield %) للكيتين والشيتوزان المحضر



قدّرت النسبة المئوية لحاصل الكيتين الناتج من معاملة قشور الأسماك والشيتوزان المحضّر من الكيتين الناتج وحسب الطريقة التي ذكرها (Al-Amery et al.2017) وحسب المعادلة التالية :-

$$\text{حاصل الكيتين \%} = (\text{وزن الكيتين الناتج/وزن قشور الأسماك}) \times 100$$

$$\text{حاصل الشيتوزان \%} = (\text{وزن الشيتوزان الناتج/وزن الكايتين الناتج}) \times 100$$

5-3 الخواص الفيزيوكيميائية للشيتوزان:

1-5-3 تحديد محتوى الرماد Ash Content :

تم تحديد محتوى الرماد باستخدام فرن الترميد في مختبر الشركة العامة لتصنيع الحبوب وفقاً لطريقة AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 2000) حيث تم أخذ 1 غرام من كل عينة في جفنة موزونة مسبقاً، وتم وضعها في فرن على درجة حرارة 575 م لمدة 6 ساعات، ثم تركت لتبرد، وتم وزن الجفنة مع الرماد وحسب النسبة المئوية للرماد حسب المعادلة التالية :

$$\text{Ash\%} = \left(\frac{W1}{W2} \right) \times 100$$

حيث ان:

W1 : وزن الرماد المتبقي بعد حرق العينة / غم.

W2 : الوزن الجاف الابتدائي للعينة قبل الحرق / غم.

2-5-3 محتوى الرطوبة (Moisture Content):

تم تقدير محتوى الرطوبة لعينة الشيتوزان باستخدام طريقة التجفيف الوزني وحسب الطريقة التي ذكرها (Sogias et al., 2008) ، حيث أخذ 1 غرام من مسحوق الشيتوزان، وتم تجفيفه في فرن حراري عند درجة حرارة 110 م لمدة 6 ساعات، ثم تم حساب محتوى الرطوبة من خلال الفرق بين الوزن قبل وبعد التجفيف. وحسب محتوى الرطوبة حسب المعادلة التالية :

$$\text{Moisture\%} = \left[\frac{(W0 - W1)}{W0} \right] \times 100$$

حيث ان:



W0: الوزن الابتدائي للعينة قبل التجفيف / غم :

W1: الوزن النهائي للعينة بعد التجفيف التام / غم

3-5-3 تقدير اللزوجة *Viscosity Determination*:

تم حساب لزوجة الشيتوزان المحضر باستخدام جهاز الفسكوميتير من نوع Ostwald ، وفقاً للطريقة التي ذكرها (Al-Amery et al. 2017) تم تحضير 15 مل من محلول الشيتوزان بتركيز 1 % (وزن/حجم) في 1% (حجم/حجم) من محلول حامض الخليك، وتم قياس الزمن اللازم لانسياب محلول الشيتوزان عند درجة حرارة 25°C، كما تم قياس الزمن اللازم لانسياب 15 مل من الماء المقطر تحت نفس الظروف .

تم حساب كثافة كل من محلول الشيتوزان والماء المقطر باستخدام قنينة الكثافة، ثم تم حساب اللزوجة النسبية (Relative Viscosity) باستخدام المعادلة التالية :

$$\eta_r \frac{\eta_1}{\eta_2} = \frac{\rho_1 t_1}{\rho_2 t_2}$$

حيث أن :

η_1 : لزوجة محلول الشيتوزان η_2 : لزوجة الماء

t_1 : زمن انسياب محلول الشيتوزان بالثواني t_2 : زمن انسياب الماء بالثواني

ρ_1 : كثافة محلول الشيتوزان (غم/مل) ρ_2 : كثافة الماء (غم/مل)

4-5-3 تقدير الوزن الجزيئي *Molecular Weight Determination*



حسب الوزن الجزيئي للشيتوزان المحضر من قشور اسماك الصبور والسمتي، اعتمادا على اللزوجة حسب الطريقة المذكورة من قبل (Al-Amery et al. (2017)، وذلك بتحضير تراكيز مختلفة من محلول الشيتوزان (0.1 ، 0.15 ، 0.2 ، 0.25 ، 0.3 ، 0.35 ، 0.4) % وزن / حجم ل في محلول حامض الخليك 1% (حجم/حجم) تم قياس اللزوجة النسبية واللزوجة المختزلة واللزوجة الجوهرية، وقدر الوزن الجزيئي من خلال معادلة مارك هوينك (Mark-Houwink equation) .

$$[\eta] = KM^a \text{ --- (1)}$$

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (y_{red}) = \lim_{c \rightarrow 0} (y_{inh}) \text{ --- (2)}$$

$$M = \left(\frac{[\eta]}{K} \right)^{\frac{1}{a}} \text{ --- (3)}$$

حيث أن:

dL/g : اللزوجة الجوهرية η

M:الوزن الجزيئي للشيتوزان

a,K : ثوابت تعتمد على نوع المادة والمذيب ودرجة الحرارة

$$K = 7.4 \times 10^{-4} \quad a = 0.74$$

3-5-5 قابلية ربط الماء (Water Binding Capacity, WBC):

قيست قابلية ربط الماء باستخدام الطريقة التي وصفها (No et al., 2000)، وذلك من خلال وزن أنبوبة نبد مركزية جافة، أُضيف إليها 0.5 غم من العينة مع 10 مل من الماء المقطر. بعد ذلك، مزجت محتويات الأنبوبة باستخدام جهاز الخلط الدوامي (Vortex) لمدة دقيقة واحدة لتشتيت العينة جيدا. ثم تركت الأنابيب بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة، مع إعادة المزج لمدة 5 ثوانٍ كل 10 دقائق. ثم نبدت



الأنابيب باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 6000 دورة/ دقيقة لمدة دقيقة واحدة. بعد التخلص من السائل الراشح، وزنت الأنابيب مرة أخرى.

تم حساب قابلية ربط الماء (%) باستخدام المعادلة الآتية:

$$\text{قابلية ربط الماء \%} = \frac{\text{الماء المرتبط (غم)}}{\text{وزن العينة (غم)}} \times 100$$

حيث أن الماء المرتبط = وزن الأنبوبة بعد المعادلة - (وزن الأنبوبة وهي فارغة + وزن العينة) .

3-5-6 قابلية ربط الدهن (Fat Binding Capacity, FBC):

قيست قابلية ربط الدهن باستخدام ذات الطريقة المعتمدة من قبل (No, Meyers & lee, 2000)، وذلك بوزن أنبوبة نبد مركزية جافة، أُضيف لها 0.5 غم من النموذج مع 10 مل من زيت الزيتون. تم خلط محتويات الأنبوبة جيداً بجهاز Vortex لمدة دقيقة واحدة، ثم تركت بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة، مع خلط سريع لمدة 5 ثوانٍ كل 10 دقائق. بعد ذلك، نبذت الأنابيب بجهاز الطرد المركزي بسرعة 6000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة، وأهمل الراشح، ثم وزنت الأنابيب مجدداً.

تم حساب قابلية ربط الدهن (%) باستخدام المعادلة التالية:

$$\text{قابلية ربط الدهن \%} = \frac{\text{الدهن المرتبط (غم)}}{\text{وزن العينة (غم)}} \times 100$$

حيث أن الدهن المرتبط = وزن الأنبوبة بعد المعادلة - (وزن الأنبوبة وهي فارغة + وزن العينة) .

3-5-7 تقدير الذائبية *Determination of solubility*:

تم تقدير ذائبية نموذج الشيتوزان المحضر وفق الطريقة المذكورة من قبل Kim et al. (2004) تم وزن 0.1 غرام من الشيتوزان ووضع في أنبوب نبد مركزي معلوم الوزن. أُضيف إلى الأنبوب 10 مل من محلول حمض الخليك (CH₃COOH) بتركيز 10% بعد ذلك، وضع الأنبوب في حاضنة هزازة بسرعة



240 دورة/دقيقة عند درجة حرارة 24°C لمدة 30 ثانية، ثم نقل إلى حمام مائي مغلي . بعد تبريد الأنبوب إلى درجة حرارة الغرفة، نبذ مركزياً بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق، ثم أُزيل الجزء الطافي . غسّلت الدقائق غير الذائبة باستخدام 25 مل من الماء المقطر، ثم نبذت مرة أخرى بنفس السرعة . أهمل الجزء الطافي، في حين جففت الدقائق غير الذائبة في فرن بدرجة حرارة 45°C لمدة 20 ساعة .

تم حساب النسبة المئوية للذائبية باستخدام المعادلة الآتية :

$$\text{solubility (\%)} = \frac{(W^1 - W^2)}{(W^1 - W^0)} \times 100$$

حيث أن :

W_0 - وزن الأنبوب الفارغ

W_1 وزن الأنبوب مع الشيتوزان قبل المعاملة

W_2 - وزن الأنبوب مع الشيتوزان غير الذائب بعد المعاملة.

3-5-8 حيود الأشعة السينية (XRD) X-ray diffraction:

تم قياس أنماط حيود الأشعة السينية للشيتوزان المحضر من قشور أسماك الصبور والسمتي بواسطة طيف الأشعة السينية X-ray وكان مصدر الأشعة السينية Cu, k α وبفولتية بلغت 40 KV وأمبيرية 20 mA وزاوية 2 θ (20) بمدى (8-80) وبسرعة 0.4 درجة/دقيقة وعلى درجة حرارة 25°C وتم حساب النسبة المئوية للتبلور حسب المعادلة التالية :

$$\text{Degree of Crystallinity \%} = \left[\frac{A_c}{A_c + A_a} \right] \times 100$$

حيث ان :



. Ac = القمم المتبلورة .

. Aa = القمم غير المتبلورة.

3-5-9 المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) Scanning electron microscope:

استخدم المجهر الإلكتروني الماسح لدراسة مورفولوجيا السطح لعينات الشيتوزان المحضر من قشور أسماك الصبور والسمتي بدون طلاء سطح العينة وتم التقاط الصورة بجهد متسارع بلغ 15 KV وقوة تكبير 500X.

3-5-10 تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR:

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR):

تم تحديد المجاميع الوظيفية للشيتوزان المحضر من قشور أسماك الصبور والسمتي عن طريق تسجيل أطياف الأشعة تحت الحمراء باستخدام جهاز (FTIR) حسب ما ورد في Wongphan & Taneesuphongs (2023).

حيث تم عمل اقراص رقيقة من العينة بوزن 0.5 nm مع بروميد البوتاسيوم الجاف KBr بنسبة (1:100 w/w) وبعدها أجري الفحص ضمن المجال (400-4000 cm⁻¹) بمعدل عدد مسحات 32 دورة وبدقة تحليلية بلغت 4cm⁻¹. تم حساب درجة نزع الأسيتيل Deacetylation Degree لأطياف الشيتوزان وفق المعادلة التالية:

$$DD\% = 100 - \left[\left(\frac{A_{1655} \text{ cm}^{-1}}{A_{3450} \text{ cm}^{-1}} \right) \times \frac{100}{1.33} \right]$$

A1655: تمثل الامتصاصية عند نطاق 1655

A3450: تمثل الامتصاصية عند نطاق 3450



5-11 تقدير النيتروجين الكلي باستخدام طريقة كدال (Kjeldahl Method):

تم استخدام طريقة كدال التقليدية لتحديد محتوى النيتروجين الكلي في الشيتوزان وحسب الطريقة المذكورة في (A.O.A.C., 1990).

3-6 الخواص الحيوية للشيتوزان:

3-6-1 الفعالية المضادة للميكروبات **Antimicrobial activity**:

اتبعت الطريقة التي وصفها (Jeyanth Allwin, et.al. (2015).

3-6-1-1 عزلات البكتريا المرضية:

استخدمت البكتريا السالبة لصبغة كرام *Escherichia Coli* والبكتريا الموجبة لصبغة كرام *Staphylococcus aureus* والمعزولة من المرضى الوافدين الى مستشفى الطفل والولادة في محافظة ميسان والمشخصة بواسطة جهاز VITEK- 2compact حفظت العزلات على وسط المرق المغذي السائل Nutrient broth في الثلاجة لحين الاستخدام.

3-6-1-2 تحضير وسط مولر هنتون:

تم تحضير الوسط الزرعي مولر هنتون حسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة، عقم الوسط بالمؤسدة على درجة حرارة 121°C ، وضغط 1.5 لمدة 15 دقيقة ثم ترك الوسط ليبرد وصب في أطباق معقمة.

3-6-1-3 تنشيط البكتريا :

نشطت العزلات على وسط المرق المغذي السائل وحضنت على درجة حرارة 37°C لمدة 24 ساعة.



بعد انتهاء فترة الحضانة تم تحضير المعلق البكتيري بتركيز 0.5 McFarland والذي يعادل 1.5 $\times 10^8$ CFU/mL.

3-6-1-4 اختبار نشاط الشيتوزان المضاد للبكتريا :

حضرت تراكيز مختلفة من الشيتوزان المستخلص من قشور الصبور A والسمتي B كلاً على حده (0.25، 0.50، 0.75، 1.0، 1.5، 2.0) μ L. تم اختبار النشاط المضاد للشيتوزان المحضر على البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام عن طريق قياس قطر منطقة التثبيط وذلك بنشر معلق البكتريا المرضية المحضر في الفقرة (3-6-1-3) على سطح وسط مولر هنتون الصلب والمحضر في الفقرة (3-6-1-2) ثم تم عمل حفر بواسطة الثاقب الفليني بقطر 5 ملم وتم ملئ كل حفره بواحد من تراكيز مستخلص الشيتوزان وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز ثم وضعت الأطباق في الحاضنة لمدة 24 ساعة على درجة حرارة 37°C ثم تم قياس قطر الهالة الخالية من النمو حول الحفر.

3-6-2 إزالة الصبغة باستخدام الشيتوزان:

درست قابلية الشيتوزان المستخلص من قشور سمك الصبور A وسمك السمتي B على أمتزاز صبغة المثيلين الزرقاء في المحلول المائي حسب الطريقة التي وصفها (بايزيد وآخرون، 2023) حضر 30 مل من محلول الصبغة بتركيز 2×10^{-5} mg/L وأضيف له 1 غرام من الشيتوزان ثم سجلت الامتصاصية باستخدام مطياف UV-Vis Spectrophotometer بطول موجي 450 nm خلال فترات مختلفة (10، 20، 30، 40، 50، 60، 70) دقيقة لمتابعة التغير في شدة الصبغة خلال الوقت ، تم إجراء التجربة تحت إضاءة أشعة الشمس . يتم ايقاف التفاعل في نهاية الوقت المحدد وذلك بطرد المحلول مركزياً للتخلص من الشيتوزان وقراءة الامتصاصية بعد ذلك.



3-6-3 تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة الـ DPPH:

Determination of Antioxidant activity by DPPH method

تم تحديد الفعالية المضادة للأكسدة للشيتوزان المستخلص من قشور اسماك الصبور والسمتي باستخدام اختبار (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) DPPH، والذي يعتمد على قياس قدرة المركبات على اصطياد الجذور الحرة من خلال التفاعل مع الجذر الحر الثابت DPPH الذي يتميز بلونه البنفسجي، إذ يؤدي تفاعل المستخلص مع هذا الجذر إلى تقليل اللون البنفسجي تدريجياً بسبب تحوله إلى الشكل المختزل عديم اللون، وقد تم اتباع الطريقة التي وردت في البروتوكول المنشور من قبل (Wang et al., 2024). تم تحضير محلول DPPH بتركيز 120 ميكرومول من خلال إذابة 0.0024 غرام من DPPH في 50 مل من الميثانول، كما تم تحضير مستخلص الشيتوزان بتركيز ابتدائي قدره 10 ملغم/مل وتم إجراء تخفيفات متعددة مباشرة في ألواح (96-well plate)، أما (BHT) Butylated Hydroxytoluene فقد استخدم كمادة قياسية موجبة بتركيز 1 ملغم/مل مذاب في DMSO (Dimethyl Sulfoxide)، وتم تحضير ضوابط سالبة تحتوي على DMSO فقط، إضافة إلى ضوابط اللون التي أضيفت لها نفس حجم المواد ولكن باستخدام الميثانول بدلاً من DPPH، ثم تم توزيع العينات والضوابط في الألواح بواقع 22 ميكرو لتر من كل مستخلص أو ضابط مع 200 ميكرو لتر من محلول DPPH، وحضنت الألواح في الظلام بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة، وبعد ذلك تم قياس الامتصاصية عند طول موجي 517 نانومتر، وتم حساب النسبة المئوية لتثبيط الجذر الحر DPPH باستخدام المعادلة التالية:

$$Inhibition \% = \left[\frac{A_c - A_s}{A_c} \right] \times 100\%$$



$$Inhibition \% = \left[1 - \frac{A_c}{A_s} \right] \times 100\%$$

A_c = الامتصاص عند 517 نانومتر للعينة الضابطة.

A_s = الامتصاص عند 517 نانومتر التي تحتوي على العينة الاختبارية.

7-3 التحليل الإحصائي:

تم اجراء التحليل الأحصائي للنتائج بأعتماد برنامج SPSS V. 28 وبتطبيق التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (C.R.D.) بتجارب one-way ANOVA table بينما أُجري التحليل الأحصائي للتجارب الخاصة بدراسة الخواص الحيوية للشيتوزان بأعتماد التجارب العاملية Factorial Experiments بالتصميم العشوائي الكامل.

تمت دراسة معنوية الفروقات بين المتوسطات اعتماداً على قيمة أقل فرق معنوي L.S.D على

مستوى احتمالية $P \leq 0.05$.

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and discussion



1-4 الخواص الفيزيوكيميائية:

درست بعض الخواص الفيزيوكيميائية للشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي وشملت

نسبة الحاصل، الرطوبة، الرماد، الوزن الجزيئي، المحتوى البروتيني، الذائبية واللزوجة (جدول 1-4).

جدول (1-4)

الخواص الفيزيوكيميائية للشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي.

الخواص الفيزيوكيميائية							مصدر الشيتوزان
اللزوجة cPs	الذائبية %	البروتين g/1g	الوزن الجزيئي KDa	الرماد %	الرطوبة %	الحاصل %	
51.126±0.249 ^a	96.6±0.36	0.014±0.008 ^a	226.1	0.438±0.00	0.156±0.02	16.56±1.3 ^a	سمك الصبور
30.477±0.206 ^b	97.0±0.20	0.0014±0.002 ^b	126.765	0.427±0.01	0.156±0.01	29.55±0.87 ^b	سمك السمتي
11.04	NS.	0.0015	-	NS.	NS.	0.506	L.S.D



4-1-1 نسبة الحاصل % Yield:

أظهرت النتائج فروقات معنوية عند مستوى $P < 0.05$ في نسبة الحاصل بين شيتوزان الصبور والسمتي إذ بلغت (16.56 ± 1.3 و 29.55 ± 0.87) % على التوالي وهي نسبة أعلى مما توصل اليه (Hassan, et.al. 2021) عند دراسته لصفات الشيتوزان المعزول من قشور السلطعون 12.39 % والروبيان 7.93 % ؛ وأقل من النسبة التي حصل عليها (Abirami, et.al. 2020) 45.21 % في دراسته لصفات الشيتوزان المعزول من قشور الروبيان. ويعزى سبب الاختلاف في نسبة حاصل الشيتوزان الى اختلاف مصادر الشيتوزان و ظروف التحضير من وقت المعاملة ونسبة المادة الأولية الى الحامض أو القاعدة المستخدمة في الأستخلاص ودرجة الحرارة (Yuan, et.al. 2020; Alrman & Alhariri, 2023) كما ان انخفاض محتوى قشور أسماك الصبور من الشيتوزان مقارنة بمحتوى قشور السمتي يعود الى الاختلاف في التركيب الكيميائي للقشور (Maktoof, et.al. 2020; Begum, et.al. 2021).

4-1-2 الرطوبة Moisture:

أظهرت النتائج ان المحتوى الرطوبي للشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي كان منخفض جداً ومتماثل للنوعين حيث بلغ (0.156 ± 0.02 و 0.156 ± 0.01) % على التوالي وهو أقل مقارنةً مع الدراسات السابقة. وذكر Islam, et.al. (2011) عند تحضير الشيتوزان من قشور الروبيان أن المحتوى الرطوبي يعتمد على الفصل والرطوبة النسبية للجو وشدة ضوء الشمس.

أن انخفاض المحتوى الرطوبي يعتبر مؤشر جيد يدل على الثباتية الخزنية العالية للشيتوزان (Walke, et.al. 2014) وبشكل عام ذكر Li, et.al. (1992) ان منتجات الشيتوزان التجارية تحتوي على أقل من 10% رطوبة.



4-1-3- Ash الرماد :

تشير النتائج إلى أن نسبة الرماد في الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي بلغت (0.438 ± 0.00) و (0.427 ± 0.01) % على التوالي وتعكس نسبة الرماد مقدار المواد غير العضوية المتبقية بعد الاحتراق الكامل للعينات، وتعد مؤشراً على نقاوة الشيتوزان وخلوه من المكونات المعدنية مثل الكالسيوم والمغنيسيوم والفوسفات. وتشير القيم المنخفضة للرماد إلى كفاءة عملية إزالة المعادن أثناء التحضير. وتتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه (عبدالكريم واخرون، 2017) والذي حصل على شيتوزان من قشور الروبيان ذات نسبة رماد بلغت 0.2 % وقدر (Rahman, et al., 2021) نسبة الرماد في الشيتوزان المستخلص من مخلفات الأسماك بنحو 0.45 % ، كما حصل (Muatsari, et.al. 2022) على شيتوزان من قشور السلطعون ذات نسبة رماد بلغت 0.96 % . وذكر (Alrman, et.al. 2023) أن لتركيز حامض HCl المستخدم في عملية إزالة المعادن تأثير كبير على نسبة الرماد في الشيتوزان وأن استخدام الحامض بتركيز 2% أدى إلى انخفاض نسبة الرماد من 39.42 ± 0.18 % في قشور سمك Tilapia إلى 0.26 ± 0.059 في الشيتوزان.

أن النسبة المنخفضة من الرماد تعزز من تطبيقات الشيتوزان في المجالات الصيدلانية والبيئية، نظراً لنقاؤه العالي وخصائصه الفيزيائية المستقرة (Rahman et al., 2021).

4-1-4 الوزن الجزيئي Molecular weight :

تم حساب الوزن الجزيئي للشيتوزان بالأعتماد على معادلة مارك-هوينك التي تربط الوزن الجزيئي باللزوجة الجوهرية (Hemmami, et.al. 2024).

نلاحظ من الجدول (4-1) ان معدل الوزن الجزيئي لشيتوزان سمك الصبور بلغ 226.1 KDa وهو أعلى مقارنةً مع معدل الوزن الجزيئي لسمك السمتي والذي بلغ 126.765 KDa وقد ذكر



Younes, et.al. (2014) ان الوزن الجزيئي يختلف باختلاف مصادر الشيتوزان ، وبشكل عام فإن الوزن الجزيئي للشيتوزان المحضر مخبرياً من الكايتين يتراوح بين 2000-50 KDa (Chenit, et.al. 2001).

وحسب ما ذكره (Minh, et.al. 2020) فإن شيتوزان السمتي قيد الدراسة يعتبر من الشيتوزان ذات الوزن الجزيئي المنخفض (أقل من 150 KDa) مما يجعله مناسب لتحضير مستحضرات نانوية طبية مثل مضادات السرطان anticancer (Yuan, et.al. 2020) وبالمقابل فإن شيتوزان الصبور يصنف ضمن أنواع الشيتوزان متوسط الوزن الجزيئي (150-700) KDa مما يمنحه خصائص ميكانيكية أفضل مثل القوة والمتانة، وهو مناسب للاستخدام في التطبيقات التي تحتاج إلى ثبات ميكانيكي أعلى (Matica, et.al., 2019).

4-1-5- محتوى البروتين Protein content:

نلاحظ من الجدول (4-1) ان الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي كان ذات محتوى منخفض جداً من البروتين اذ بلغت لشيتوزان الصبور 0.14 ± 0.008 وهي أعلى بشكل معنوي مقارنةً مع شيتوزان السمتي 0.0014 ± 0.002 وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل اليه Allwin,et.al. (2015) عند دراسته لخواص الشيتوزان المعزول من الروبيان الأبيض حيث بلغت نسبة البروتين 0.96. ان انخفاض نسبة البروتين في الشيتوزان تدل على كفاءة عملية إزالة البروتين من القشور وأشار Rasweefali, et.al.(2022) عند دراسة كفاءة عملية إزالة البروتين من روبيان طين أعماق البحار *Solenocera hextii* باستخدام تراكيز مختلفة من القاعدة NaOH (0.25-2.0) M ان تركيز 2M NaOH كان الأفضل وبنسبة إزالة بلغت أكثر من 98%.



6-1-4 الذائبية Solubility:

لم تظهر النتائج (جدول 1-4) فروقات معنوية في قابلية ذوبان الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي اذ بلغت (96.6 ± 0.36 و 97.0 ± 0.20) على التوالي، وبشكل عام كانت هذه النتيجة قريبة من نتائج دراسات سابقة (Abed-Al- (Nessa, et.al. 2010; Alwin, et.al. 2015; Kareem, et.al. 2017; Anggraeni, et.al. 2024).

تعتمد درجة ذوبان الشيتوزان على درجة نزع الأستلة وتوزيع مجاميع الأسيتيل المتبقية على طول السلسلة (Anggraeni, et.al. 2024) ووجد (Cheng, et.al. 2020) ان الشيتوزان المستخلص بطريقة الميكروويف ذات درجة نزع الأستلة العالية يكون أكثر ذوباناً من الشيتوزان المستخلص في الحمام المائي على درجات حرارة عالية والأقل درجة نزع الأستلة.

7-1-4 اللزوجة Viscosity:

نلاحظ من الجدول (1-4) ان قيم لزوجة الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي بلغت (51.126 ± 0.24 و 30.477 ± 0.20) cPa على التوالي ، وتعتبر هذه القيم أقل من قيم لزوجة الشيتوزان المعزول من قشور الروبيان حيث بلغت (228 ± 2.9) cPa (Walke, et.al. 2014) و (74.11) cPa (Abed-Al- Kareem, et.al. 2017) وأقل من لزوجة الشيتوزان المعزول من قشور السلطعون (68.19) cPa (Mulatsari, et.al. 2022).

ان الأرتفاع المعنوي للزوجية الشيتوزان المعزول من سمك الصبور مقارنةً مع لزوجة الشيتوزان المعزول من سمك السمتي يعزى الى الوزن الجزيئي العالي (226.1) KDa وانخفاض درجة نزع الأستلة (85)% لشيتوزان الصبور مقارنة مع شيتوزان سمك السمتي (126.765) KDa و (86.19)% على التوالي اذ ان لدرجة نزع الأستلة والوزن الجزيئي تأثير كبير على لزوجة الشيتوزان حيث ان انخفاض الوزن



الجزئي وأرتفاع درجة نزع الأستلة تؤدي الى انخفاض لزوجة الشيتوزان (Nessa,et.al. 2010; Aichayawanich & Saengprapaitp, 2019).

4-1-8 قابلية ربط الماء والدهن Water and Fat binding capacity:

4-1-8-1 قابلية ربط الماء WBC:

يبين الشكل (1-4) قابلية الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي على ربط الماء حيث بلغت (350.8-360.9) % على التوالي وهذه النتيجة تتفق مع القيم التي حصل عليها (Nessa, et.al. 2010) اذ بلغت للشيتوزان المعزول من قشور الروبيان 345.6 % . كما أقتربت هذه النتيجة نوعاً ما من القيم التي حصل عليها (Kumari, et.al. 2016) عند دراسته لخصائص الشيتوزان المعزول من قشور أسماك Labeo rohita حيث بلغت 492 % . بينما كانت هذه النتيجة أقل مما حصل عليه (Walke, et.al. 2014) اذ بلغت 669 % لشيتوزان قشور الروبيان. وأشار (Fernando-Kim, 2004) الى ان قابلية ربط الماء للشيتوزان المعزول من قشور أسماك Crawfish اختلفت باختلاف ترتيب مراحل استخلاص الشيتوزان حيث تراوحت 274.2-941.5 % .

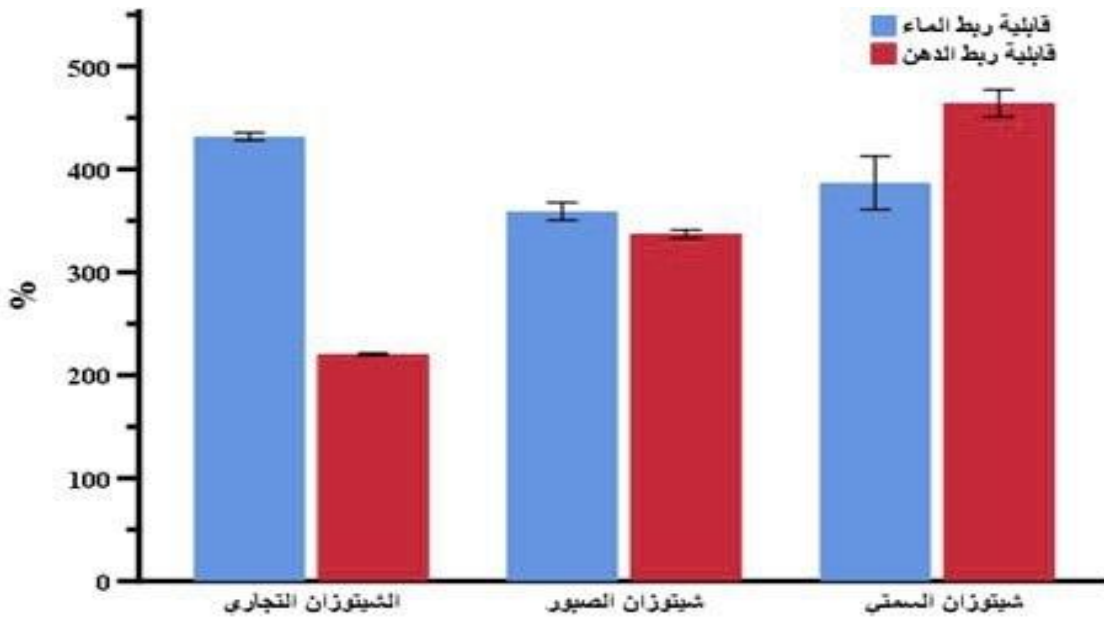
4-1-8-2 قابلية ربط الدهن FBC:

أظهر شيتوزان قشور سمك السميتي قابلية أعلى بشكل معنوي على ربط زيت الزيتون مقارنةً مع قابلية شيتوزان سمك الصبور حيث بلغت (337.3 و 463.98) % على التوالي (شكل ---). وبشكل عام أظهر كلا النوعين قدرة جيدة على ربط الدهن وبنسبة أعلى مقارنةً مع نتائج دراسة قام بها (Kumari, et.al. 2016) عند دراسة قابلية شيتوزان قشور سمك Labeo rohita حيث بلغت 226% وشيتوزان قشور الروبيان 246%. بينما حصل (Fernando-Kim, 2004) على قيم أعلى



حيث بلغت قابلية شيتوزان سمك Crawfish والمستخلص بنفس ظروف استخلاص دراستنا الحالية على ربط زيت الزيتون 505.4 %.

ان قابلية الشيتوزان على ربط الماء والدهن تختلف باختلاف مصدر الشيتوزان وطريقة الأستخلاص وكذلك على ترتيب مراحل أستخلاص الشيتوزان من القشور. وفسر الباحثون هذا الأختلاف الى أختلاف درجة نزع الأسيثيل والوزن الجزيئي كما ان لدرجة حموضة الوسط وتركيز الشيتوزان تأثير كبير على قابلية الشيتوزان على ربط الماء والدهن (Helen, L. & Lauzon, R. 2015 ; Panith, et.al. 2016).



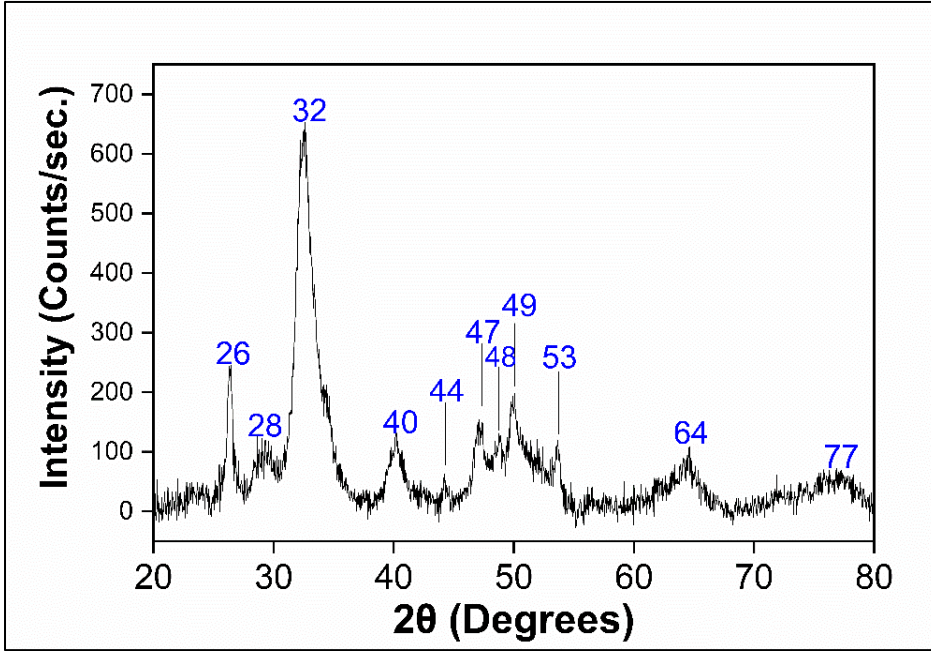
شكل (4_1)

قابلية الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي على ربط الماء والدهن.



9-1-4 أنماط حيود الأشعة السينية XRD للشيتوزان:

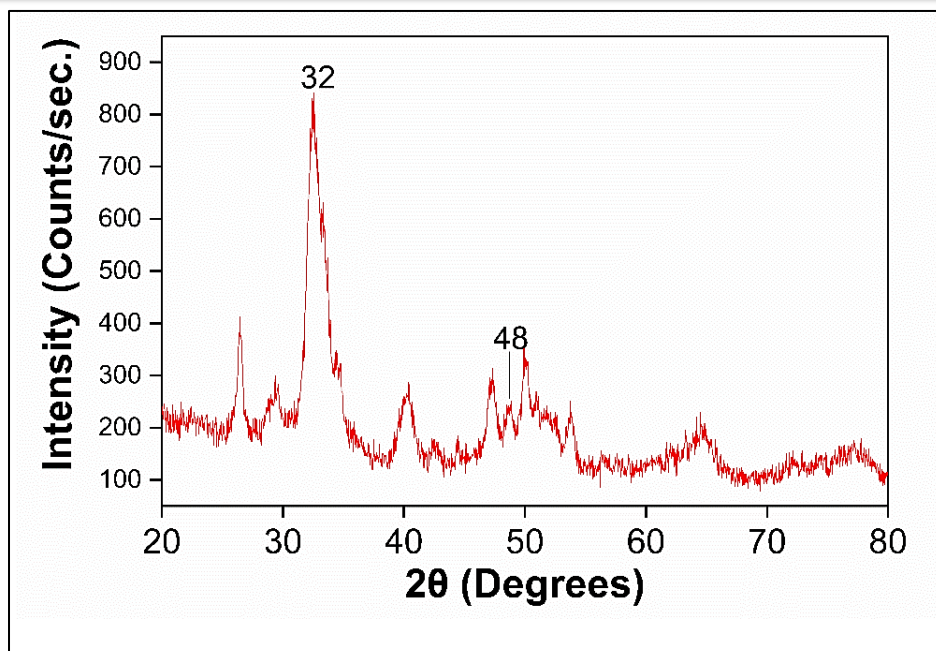
تم قياس أنماط حيود الأشعة السينية للشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي لتحديد درجة التبلور. يظهر الشكل (4-2) ان الشيتوزان المعزول من قشور سمك الصبور أظهر حيوداً عند مناطق 2θ تراوحت من 26.35° الى 64.42° مع أعلى رنين عند $32.5^\circ = 2\theta$ ؛ بينما كان حيود الأشعة السينية للشيتوزان المعزول من قشور سمك السمتي (B) عند مناطق 2θ تراوحت من 9.28° الى 64.59° مع أعلى رنين عند $32.45^\circ = 2\theta$ وهذه النتيجة تتفق مع (Kumari & Rath (2014) حيث شخص خمس مناطق متبلورة للشيتوزان المعزول من قشور أسماك Labeo rohita عند 2θ تراوحت من 10° الى 80° ؛ وأشار (Kumari, et.al. (2015) ان وجود قمم متعددة للشيتوزان المعزول من قشور الأسماك ترمز الى بصمة مركب الشيتوزان السمكي. على العكس من الشيتوزان المعزول من قشور الروبيان الذي عادة يظهر قمتين حادتين (Hemmami,et.al. 2024 ; عبدالكريم وآخرون (Islam, et.al. 2011; .



Pos. [°2Th.]	Height [cts]	FWHM Left [°2Th.]	d-spacing [Å]	Rel. Int. [%]	Tip Width
26.3559	183.14	0.3936	3.38166	42.96	0.4723
32.5531	426.33	0.9446	2.75065	100.00	1.1336
40.1823	75.34	0.6298	2.24426	17.67	0.7557
47.1285	72.94	0.6298	1.92842	17.11	0.7557
49.9436	93.31	0.4723	1.82612	21.89	0.5668
53.6523	63.66	0.3149	1.70831	14.93	0.3779
64.4250	45.10	1.5744	1.44625	10.58	1.8893

شكل (4_2a)

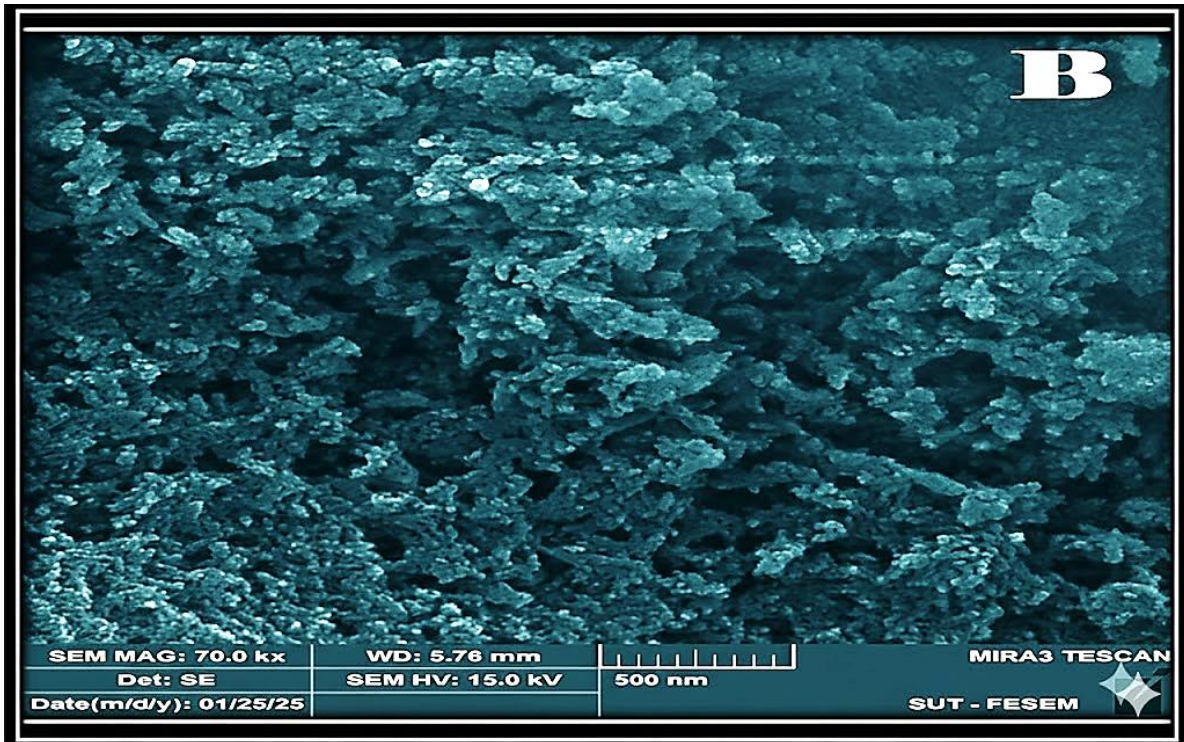
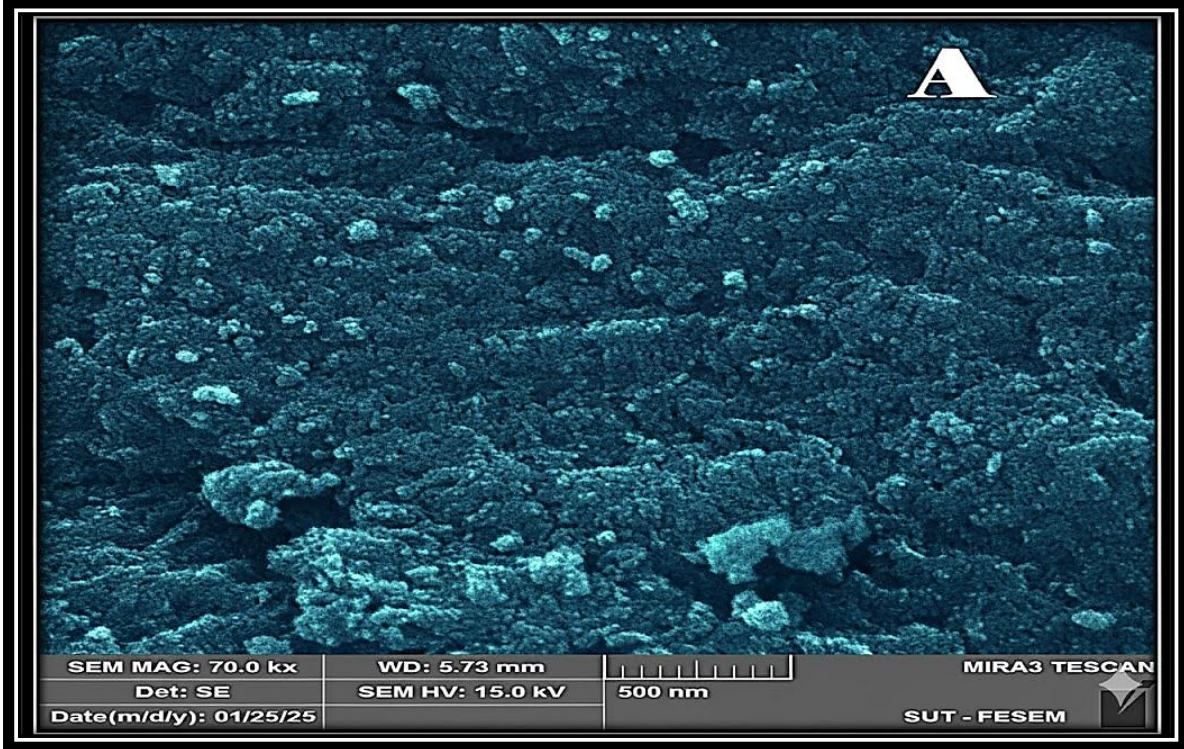
حيود الأشعة السينية للشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور



Pos. [°2Th.]	Height [cts]	FWHM Left [°2Th.]	d-spacing [Å]	Rel. Int. [%]	Tip Width
9.2800	34.26	2.5190	9.53012	7.12	3.0228
26.4775	169.79	0.3149	3.36640	35.30	0.3779
32.4993	481.05	0.7872	2.75509	100.00	0.9446
40.2771	94.63	1.2595	2.23920	19.67	1.5114
47.3205	112.57	0.5510	1.92104	23.40	0.6612
48.7172	40.90	0.4723	1.86918	8.50	0.5668
50.0457	116.90	0.4723	1.82263	24.30	0.5668
53.7756	62.12	0.4723	1.70469	12.91	0.5668
64.5986	54.29	1.2595	1.44278	11.29	1.5114

شكل (4_2b)

حيود الأشعة السينية للشيتوزان المعزول من قشور أسماك السمطي



شكل (3-4)

صور المجهر الإلكتروني الماسح SEM للشيتوزان المعزول من قشور اسماك الصبور (A) والسمتي (B).



4-1-10 المجهر الالكتروني الماسح SEM:

يبين الشكل (3_3) الشكل المظهري لسطح الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي بواسطة المجهر الإلكتروني الماسح SEM وعلى قوة تكبير 70.0 Kx ويظهر ان شيتوزان الصبور والسمتي ذات شكل متشابه مورفولوجياً وعلى شكل طبقات خشنة وناعمة من الرقائق مع مسامية عالية الكثافة (high-density porous) بأقطار مختلفة على سطح أملس وهذا مشابه لما وجدته Ogretmen, et.al. (2022) حيث أشار الى ان مورفولوجيا سطح الشيتوزان المعزول من قشور الروبيان الوردى *Parapenaeus longirostris* يكون على شكل طبقات من رقائق تحتوي على فتحات. ان وجود المسامات على سطح الشيتوزان يرجع الى ازالة البروتين والمعادن من القشور عند تحضير الكايتين كما ان كثافة هذه المسامات على السطح يدل على كفاءة ازالة البروتين والمعادن (Deproteinization & Demineralization) من القشور (Nikhitha, 2023).

4-1-11 تقنية تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء فورييه (FTIR):

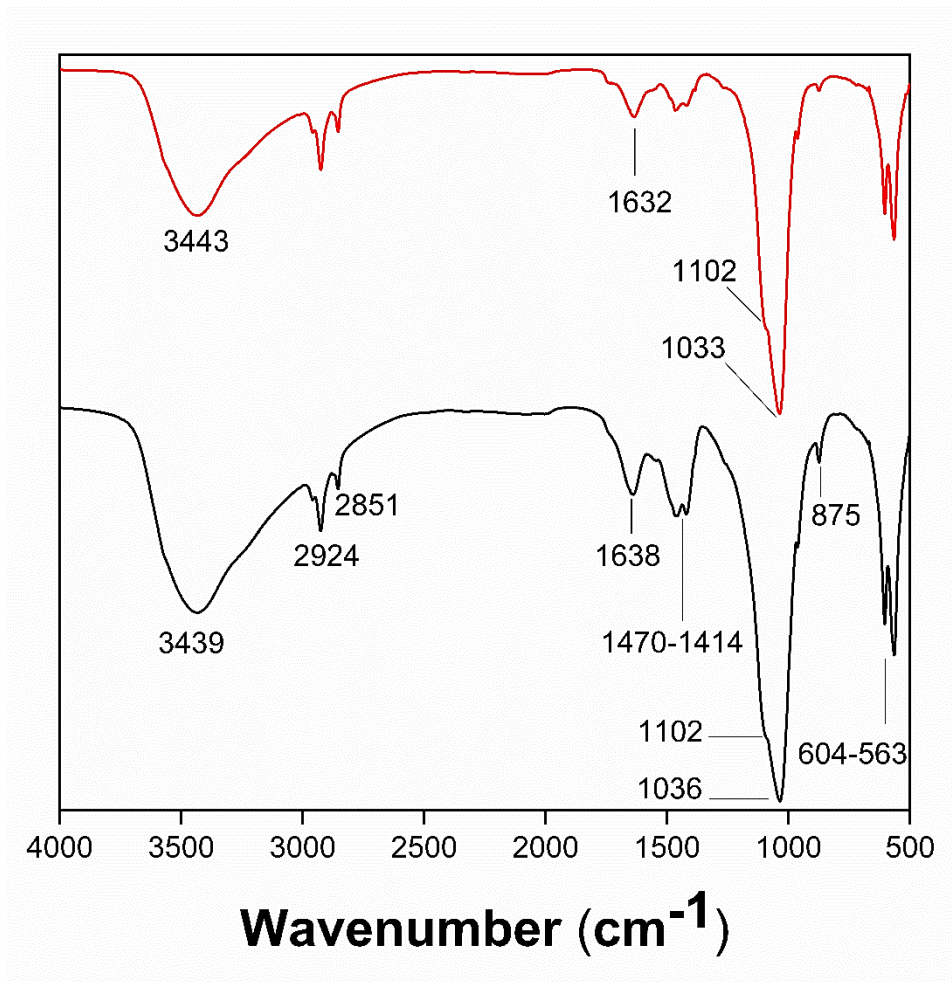
استخدمت تقنية تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء فورييه (FTIR) لتحديد المجاميع الوظيفية ودرجة نزع الأستلة في الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي.

نلاحظ من الشكل (--) ظهور أمتصاص قوي في المنطقة 3443-3439 سم⁻¹ ناتج من تمدد روابط كل من الهيدروكسيل (O-H) والأميدات (N-H) كما تظهر نطاقات امتصاص عند حوالي 2924 و 2851 سم⁻¹ تعود الى التمدد المتماثل وغير المتماثل لمجموعة (C-H) على التوالي وهي قمم نموذجية للسكريات مثل الكلوكان وغيرها (Wolkers, et.al. 2003). وتم تعيين الأنحاء الشديد عند 1635 سم⁻¹ الناتج من اهتزاز الأنحاء لمجموعة الـ (N-H) وهي قمة مميزة للشيتوزان (Mohanasrinivasan, et.al. 2014) ، من جانب اخر تم تأكيد وجود مجموعات الأسيتات N-acetyl المتبقية من خلال



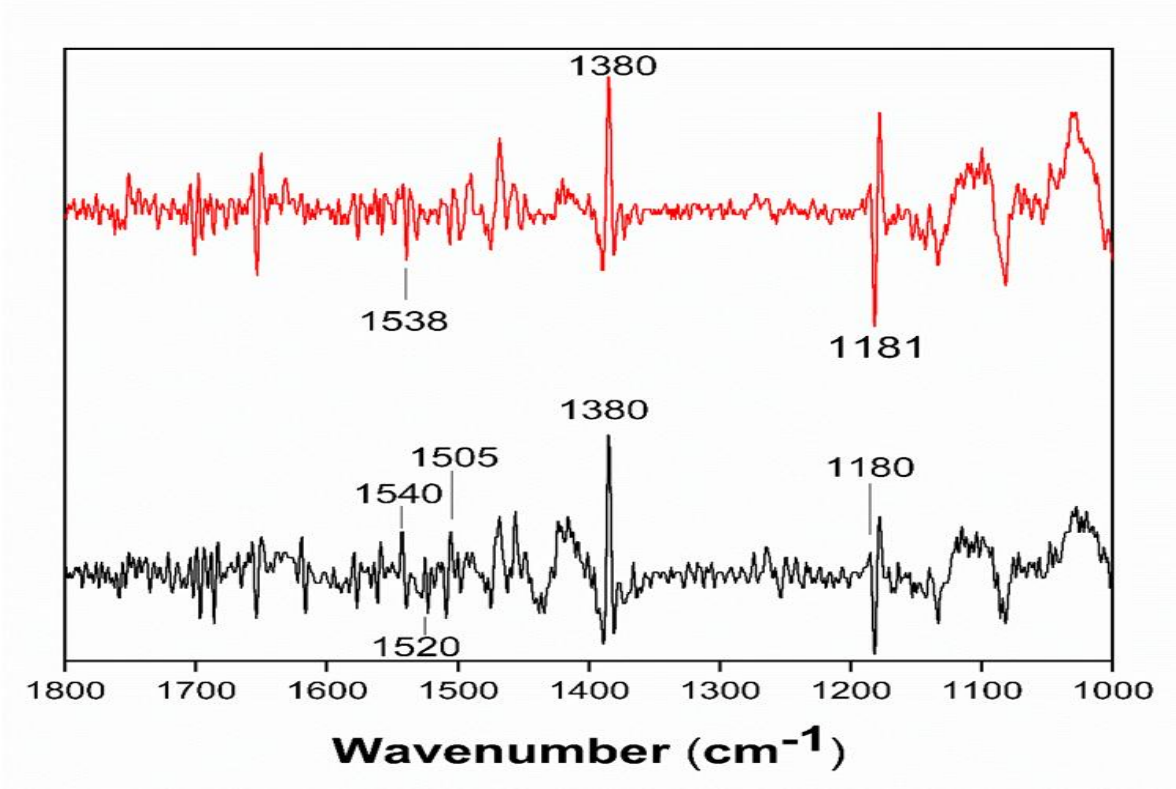
النطاقات عند 1638 سم⁻¹ (امتداد مجموعة الكربونيل C=O أو للأميد I) و 1414 سم⁻¹ أو 1380 في المشتقة الثانية (امتداد C-N للأميد III).

وبشكل عام نلاحظ أن جميع النطاقات الرئيسية في أطيف عينات الشيتوزان كانت متطابقة مع نتائج الباحثين الاخرين (Islam, et.al. 2015; Cardenas-Trivino & Soto-Seguel, 2020 ; Kanwal, et.al. 2024). كما يمكن ملاحظة ان أطيف الأشعة تحت الحمراء للشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي متشابهة الى حد كبير والأختلاف فقط في كثافات بعض القمم خصوصاً في المناطق 1638-1414 سم⁻¹



الشكل (4-4)

أطيف الأشعة تحت الحمراء للشيتوزان المعزول من سمك الصبور (اللون الاسود) وسمك السمتي (اللون الأحمر)



الشكل (4_5)

أطياف الأشعة تحت الحمراء للمشتقة الثانية للشيتوزان المعزول من سمك الصبور (اللون

الاسود) وسمك السمتي (اللون الأحمر)



جدول (2-4)

المجاميع الوظيفية للشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور و أسماك السمطي.

المصدر	الملاحظات	المنطقة سم ⁻¹	المجموعة الوظيفية
Islam, et.al. 2015 Kanwal, et.al. 2024 Elhaes, et.al. 2024	تكون أميدات الـ A و B متداخلة مع مجموعة الهيدروكسيل	3439-3443	0-H
Cardenas-Trivino & Soto-Seguel, 2020	المثلين + الاثيلين	2924-2851	C-H(CH ₃ , CH ₂)
Cheng, et.al. 2020 Cardenas-Trivino & Soto-Seguel, 2020		1632-1638	C=O
Varma & Vasudevan, 2020	ضعيفة جداً	1470-1414	δ C-H ₃ , C-H ₂
Cardenas-Trivino & Soto-Seguel, 2020 Elhaes, et.al. 2024	تظهر هذه المنطقة بشكل واضح في المشتقة الثانية	1540-1505	δN-H
Cardenas-Trivino & Soto-Seguel, 2020	تظهر هذه المنطقة بشكل واضح في المشتقة الثانية	1380	C-N
Islam, et.al. 2015		1102	C-O-C
Cardenas-Trivino & Soto-Seguel, 2020		1033-1036	C-O
Vigneshwari & Gokula, 2018	دليل على وجود روابط كلايكوسيديه التي تربط الوحدات السكرية	875-500	V(C-O-C) Pyranose (604-563)



تعد درجة نزع الأستلة (Deacetylation Degree (DD) أحد العوامل الرئيسية التي تميز الشيتوزان وذلك لأن انتاجه يتم عن طريق نزع الأستلة (أزالة مجاميع الأسيثيل) من الكايتين. أن استخدام التحليل الطيفي FTIR تعتبر طريقة سهلة نسبياً وغير مباشرة لتأكيد نزع مجاميع الأسيثيل من الكايتين وذكر (Vande velde & Kiekens (2004) أن النطاق 1655 سم^{-1} (C=O) مع زيادة درجة نزع الأستلة سوف يخضع لتغيرات ويضمحل أخيراً، كما يتغير شكل النطاقات بين $1500-1750 \text{ سم}^{-1}$.

تم حساب درجة نزع الأستلة %DD للشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي بتطبيق المعادلة الرياضية التي تعتمد على مقدار الأمتصاصية للأמידات (مجموعة الكربونيل) في مجموعات الأسيثيل ومجموعات الهيدروكسيل عند الطول الموجي 1655 سم^{-1} و 3450 سم^{-1} حيث بلغت %86.19 و %85 على التوالي وبالتالي يعتبر الشيتوزان المعزول من نوع الشيتوزان عالي درجة نزع الأستلة حيث يمكن تصنيف الشيتوزان الى نوعين اعتماداً على درجة نزع الأستلة الى شيتوزان عالي درجة نزع الأستلة (HDD) (70-99%) وشيتوزان منخفض درجة نزع الأستلة (LDD) (55-70%) (Anggraeni, et.al. 2024). هذه النتيجة تتفق مع ما توصلت اليه سمية واخرون (2023) والتي حصلت على شيتوزان بدرجة نزع الأستلة بلغت %86 من الفطر *Agaricus bisporus*.

تعتمد درجة نزع الأستلة للشيتوزان على عدة عوامل منها مصدر الكيتين، تركيز القاعدة المستعملة ودرجة حرارة ومدة المعاملة وذكر (Aichayawanich & Saengprapaitip(2019) ان استخدام نسب مختلفة بين القاعدة NaOH والكايتين (1:4 ، 1:6 و 1:8) وأوقات معاملة مختلفة (35، 45 و 55) دقيقة أعطت شيتوزان بدرجات نزع أستلة مختلفة تراوحت بين 17.60-21.64%. كما حصل (Kasongo, et.al. (2020) على قيم مختلفة لدرجة نزع الأستلة للشيتوزان المعزول من الفطر *Termitomyces titanicus* باستخدام تراكيز مختلفة من القاعدة وأوقات معاملة مختلفة وحصل على أفضل درجة نزع الأستلة بلغت 69.50% باستخدام تركيز NaOH 50% ووقت معاملة 120 دقيقة.



4-2 الخصائص الحيوية للشيتوزان:

4-2-1 الفعالية المضادة للبكتريا :

درست فعالية تراكيز مختلفة (0.25، 0.5، 0.75، 1.0، 1.5 و 2) $\mu\text{g/ml}$ من الشيتوزان التجاري والشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي المضادة على تثبيط نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام (*E. coli*) والموجبة لصبغة كرام (*Staph. aureus*). ويبين الشكل (---) ان الشيتوزان على اختلاف مصادره أظهر تأثيراً مثبطاً لنمو بكتريا *E. coli* اذ بلغ قطر منطقة التثبيط للشيتوزان التجاري وللتراكيز أعلاه (19.67 ± 0.577 ، 18.0 ± 2.0 ، 15.33 ± 0.577 ، 17.00 ± 2.646 ، 13.67 ± 1.528) mm على التوالي ولشيتوزان الصبور بلغت (19.33 ± 0.577 ، 18.33 ± 2.082 ، 16.67 ± 1.528) mm على التوالي ولشيتوزان السمتي بلغت (19.67 ± 0.577 ، 18.0 ± 3.464 ، 16.0 ± 1.00 ، 15.33 ± 0.577 ، 13.33 ± 3.055) mm على التوالي (جدول 3-4). وهذه النتيجة تتفق مع نتائج باحثين اخرين وجدوا أن الشيتوزان المعزول من قشور الروبيان يمتلك قابلية على تثبيط نمو بكتريا *E. coli* (Hongpattarakere & Riyaphan, 2008; Walke, et.al., 2014; Abirami, et.al., 2020) والشيتوزان المعزول من قشور ثمار نبات جوز الخبز أو جوز المايا (Pech-Cohuo, et.al., 2022). كما تظهر النتائج ان بكتريا *Staph. aureus* كانت أكثر مقاومة لتأثير الشيتوزان حيث أقصر التأثير المثبط للشيتوزان التجاري على التراكيز المنخفضة (0.25 و 0.50) $\mu\text{g/ml}$ حيث بلغ قطر منطقة التثبيط (17.67 ± 2.082 و 16.33 ± 1.15) mm على التوالي أما شيتوزان الصبور لم يظهر أي تأثير مثبط ضد هذه البكتريا بينما أظهر شيتوزان السمتي قدرة عالية على تثبيط نمو بكتريا *Staph. aureus* وبجميع التراكيز اذ بلغ قطر منطقة التثبيط (15.67 ± 0.577 ، 15.33 ± 0.577 ، 15.0 ± 1.732) mm على التوالي وهذه القيم تنخفض بشكل معنوي عن قيم التثبيط للبكتريا



السالبة لصبغة كرام وهذه النتيجة تتفق مع ما وجدته Walke, et.al., (2014) الذي لاحظ انخفاض التأثير المثبط للشيتوزان على البكتريا الموجبة لصبغة كرام ويعزى هذا الانخفاض إلى طبيعة التركيب الجدار الخلوي للبكتريا الموجبة، إذ تتميز بوجود طبقة سميكة من البيبتيدوغلايكان تعمل كحاجز يحد من نفاذية جزيئات الشيتوزان إلى الغشاء الداخلي، مما يقلل من تأثيره التثبيطي.

في المقابل، تمتلك البكتريا السالبة لصبغة كرام جداراً خلوياً أرق وغشاء خارجياً يحتوي على شحنات سالبة، مما يسهل التفاعل الكهروستاتيكي مع الشيتوزان المشحون بالموجب ويؤدي إلى اضطراب في نفاذية الغشاء وتسرب محتويات الخلية وموتها.

وهذا التفسير يتفق مع ما ذكره Walke وآخرون (2014) الذين لاحظوا انخفاض التأثير المثبط للشيتوزان تجاه البكتريا الموجبة لصبغة كرام مقارنة بالسالبة، وعزوا ذلك إلى اختلاف تركيب الجدار الخلوي بين المجموعتين.

. وأكد (Abirami, et.al.(2020) انه من الممكن تعزيز الخواص الحيوية للشيتوزان عن طريق تدعيمه ببعض المركبات مثل البولي فينول أو تحويله الى أغشية رقيقة.

ترتبط خصائص الشيتوزان المضادة للميكروبات بأحتوائه على مجاميع الأمين الكاتيونية والتي ترتبط مع المركبات ذات الشحنة السالبة والموجودة في الجدار الخلوي والغشاء السيتوبلازمي للبكتريا (Martín-López, et.al., 2020) وقد وضعت ثلاث اليات لتفسير نشاط الشيتوزان المضاد للميكروبات وهي تفاعل المجاميع الوظيفية الموجبة للشيتوزان مع الفوسفوليبيدات الموجودة في الغشاء الخلوي مما يؤثر على نفاذية الخلية الميكروبية وبالتالي موتها أو يعمل الشيتوزان كعامل مخلبي يرتبط بالمعادن النزرة بشكل أنتقائي مما يسبب نقصاً في العناصر الغذائية في الوسط وبالتالي يمنع نمو الخلية الميكروبية ؛ كما



ان للشيتوزان ذات الوزن الجزيئي المنخفض القدرة على اختراق الجدار الخلوي والتفاعل مع الحامض النووي وبالتالي يؤثر على تخليق البروتين مما يؤدي الى موت الخلية (Younes, et.al., 2014) .

يبين الجدول (3-4) أن التأثير المثبط للشيتوزان ينخفض بزيادة التركيز وهذا يتفق مع ما أشار اليه (Anggraeni, et.al., 2024) عند دراسته فعالية الشيتوزان المعزول من قشور السلطعون والجنادب المثبته لنمو البكتريا وقد فسر سبب هذا الانخفاض في النشاط المضاد للبكتريا مع زيادة التركيز من خلال الترتيب المكاني لسلاسل الشيتوزان حيث تؤدي تركيزات الشيتوزان المنخفضة الى توزيع جزيئي أكثر تجانساً في المذيب مع عدد منخفض من نقاط الاتصال بين السلاسل القريبة وبالتالي زيادة المواقع المشحونة المتاحة للأقتران الخارجي.

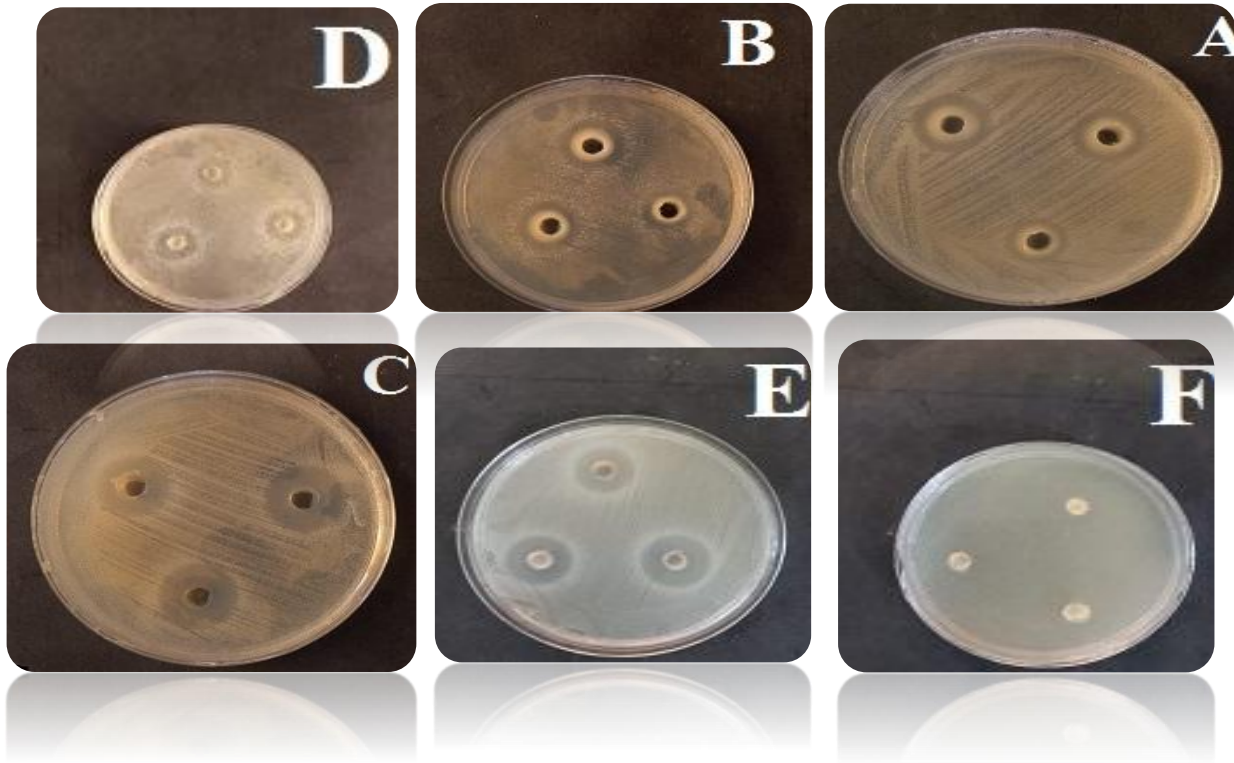
جدول (3-4)

الفعالية المضادة للميكروبات (Antimicrobial activity) للشيتوزان المستخلص من قشور أسماك الصبور والسمتي

Staph. Aureus (قطر منطقة التثبيط (mm)						E. coli (قطر منطقة التثبيط (mm)						العزلات
2.0	1.5	1.0	0.7 5	0.50	0.25	2.0	1.5	1.0	0.75	0.50	0.2 5	تركيز الشيتوزان µg/ml
0	0	0	0	16.3 3±1. 15	17.6 7±2. 082	0	13. 67± 1.5 8	17.0 0±2. 646	15.3 3±0. 577	18.0 0±2. 0	19. 67± 0.5 77	Stand ard
0	0	0	0	0	0	14.3 3±2. 082	15. 0±1 .0	15.3 3±0. 577	16.6 7±1. 528	18.3 3±2. 082	19. 33± 0.5 77	الصبور
11. 6± 2.8 87	14. 0±1 .73 2	14. 0±1 .73 2	15. 0±1 .73 2	15.3 3±0. 577	15.6 7±0. 577	12.6 7±2. 517	13. 33± 3.0 5	15.3 3±0. 577	16.0 ±1	18.0 ±3.4 64	19. 67± 0.5 77	السمتي

L.S.D = 1.55 لمصدر الشيتوزان

L.S.D لتراكيز الشيتوزان = 0.22



A= E.coli شيتوزان تجاري

B= Staph. Aureus شيتوزان تجاري

C= E.coli شيتوزان السمّي

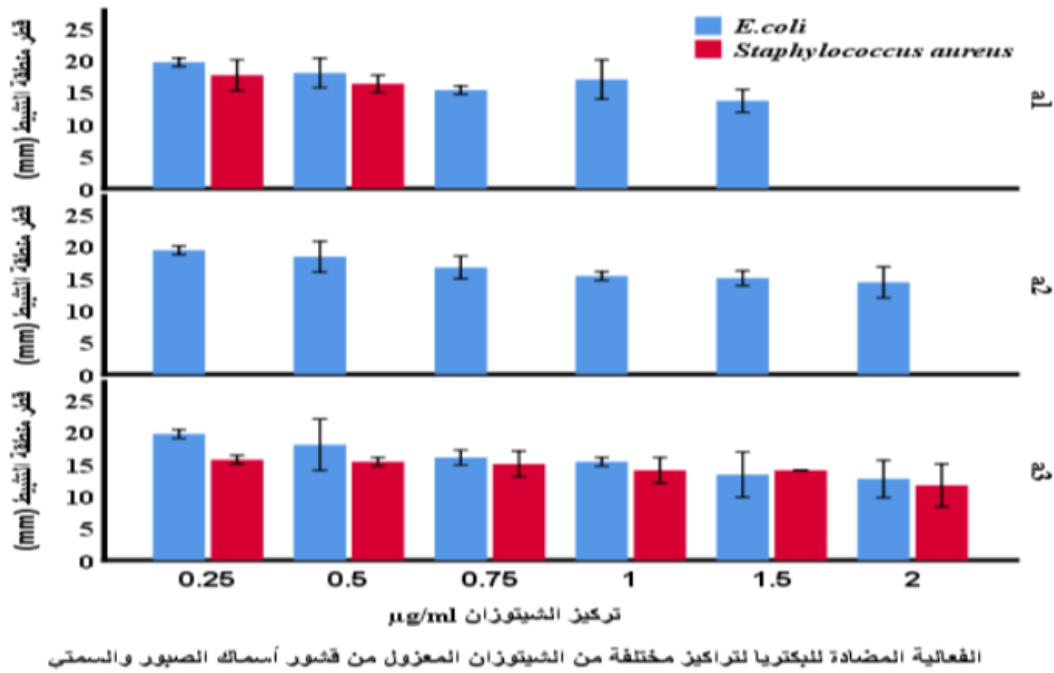
D= Staph. Aureus شيتوزان السمّي

E= E.coli شيتوزان الصبور

F= Staph. Aureus شيتوزان الصبور

شكل (4-6)

الفعالية المضادة للبكتريا للشيتوزان التجاري والشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمّي.



شكل (4-7)

الفعالية المضادة للبكتيريا لتراكيز مختلفة من الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي

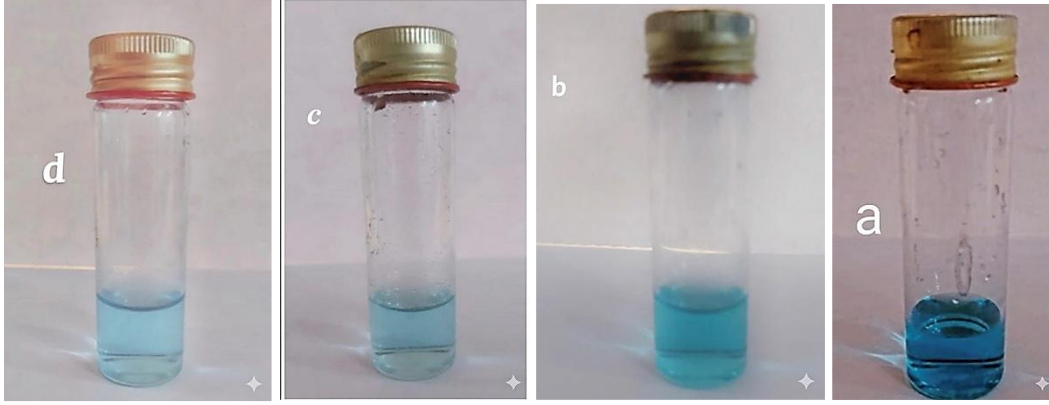
2-2-4 إزالة صبغة المثيلين الأزرق:

درست قابلية الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي على إزالة صبغة المثيلين

الأزرق من الماء من خلال ملاحظة التغير في الأمتصاصية لمحلول الصبغة المائي بتركيز ابتدائي 20

µg/ml بعد معاملتها مع 1 gm من الشيتوزان خلال وقت المعاملة (0، 10، 20، 30، 40، 50، 60)

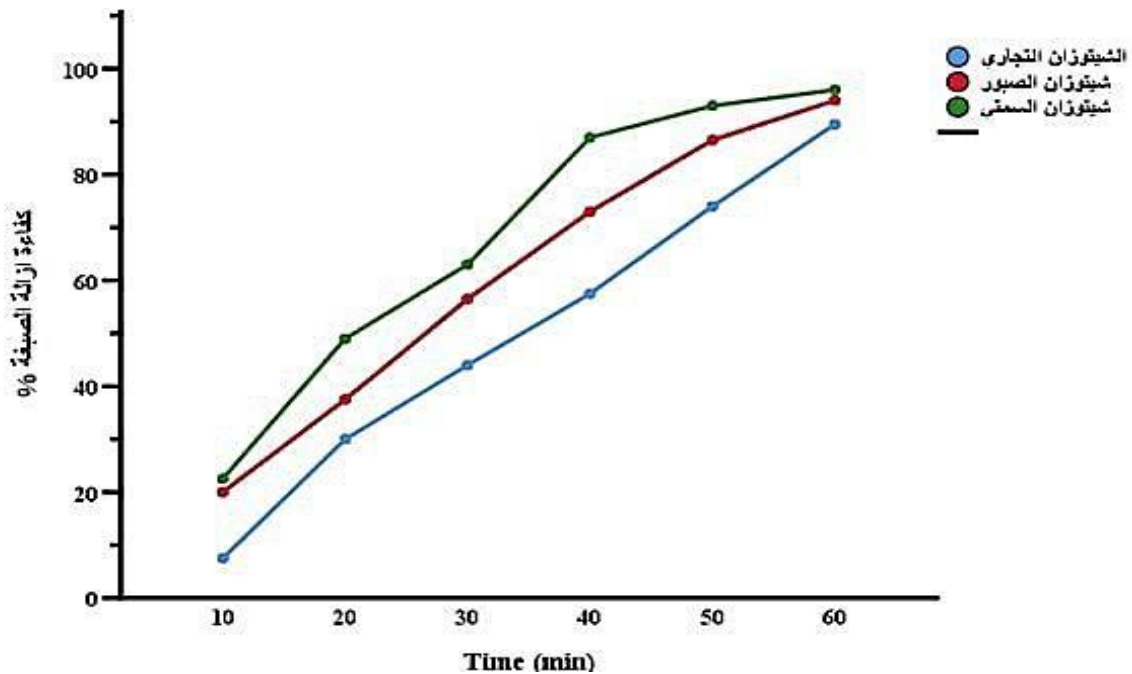
دقيقة (شكل 4-8).



شكل (4_8)

قدرة الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي على إزالة صبغة الميثيلين الأزرق من الماء

- a: صبغة فقط
- b : Standerd
- c: شيتوزان الصبور
- d: شيتوزان السمتي



شكل (4-9)

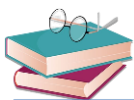
كفاءة الشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي على إزالة صبغة الميثيلين الأزرق من الماء خلال الوقت



نلاحظ من الشكل (4-9) ان كفاءة ازالة الصبغة لشييتوزان سمك السمطي اُرتفعت مع الوقت حيث بلغت (0، 22.5، 49، 63، 87، 93، 96) % على التوالي وهي لا تختلف بشكل معنوي مقارنة مع شييتوزان سمك الصبور (0، 20، 37.5، 56.5، 73، 86.5، 94) % على التوالي بينما كانت الفروقات معنوية $P < 0.05$ عند مقارنتها مع كفاءة الشييتوزان التجاري (0، 7.5، 30، 44، 57.5، 74، 89.5) % على التوالي.

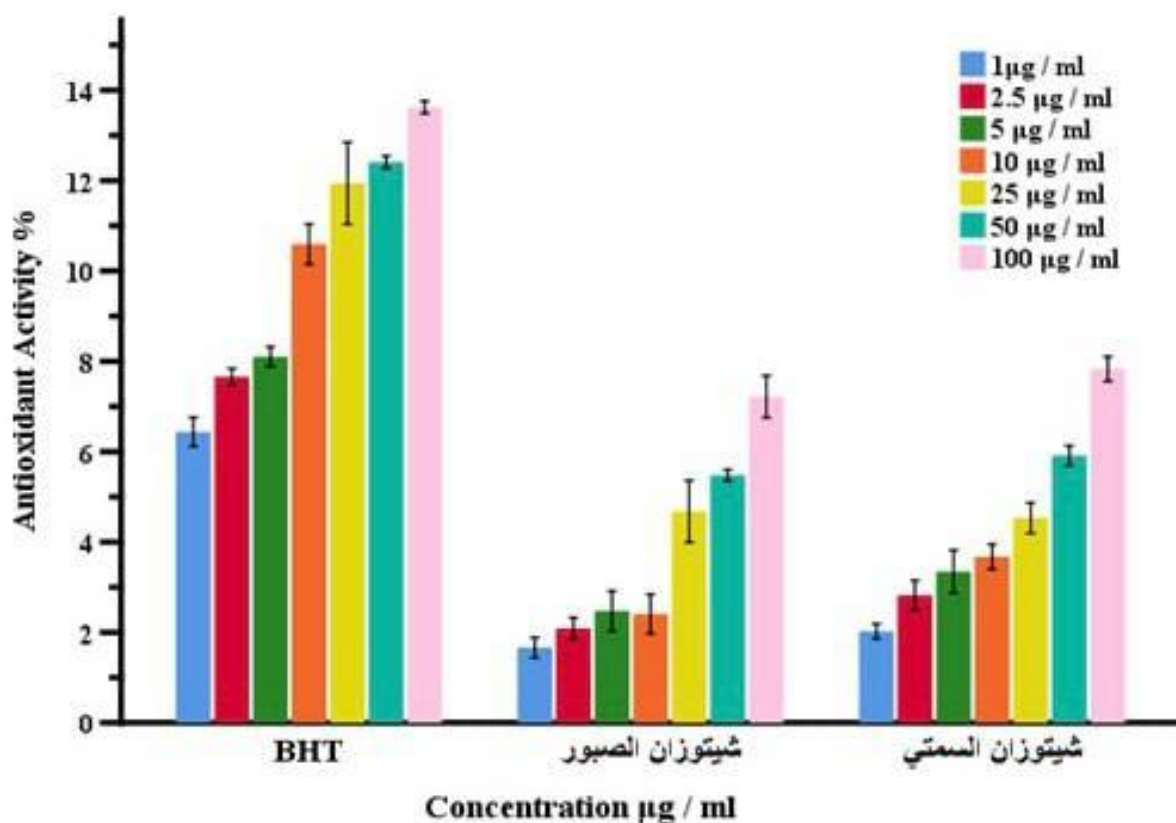
أظهرت النتائج ان معدل أمتزاز الصبغة على الشييتوزان بدأ بمعدل أمتزاز أولي سريع خلال الوقت حتى الدقيقة 40 من وقت المعاملة ثم بدء معدل الأمتزاز بالانخفاض وهذا يتفق مع ما توصل اليه (Abdul Hadi & Mohammad, 2023) عند دراسة كفاءة الشييتوزان المعزول من قشور أسماك Crawfish على ازالة صبغة المثلين الأزرق حيث أظهرت النتائج ان الشييتوزان أزال الصبغة بفاعلية من مياه الصرف الصناعي الملوثة حيث بلغت كفاءة الأزالة 94 % وقد بين ان عملية الأمتزاز تحدث على أشدها خلال الثلاثون دقيقة الأولى من بدء عملية الأمتزاز يتبعه انخفاض تدريجي وفسر سبب ذلك الى أنه في البداية يحتوي الشييتوزان على وفرة من المجاميع الوظيفية الفعالة (الأمين والهيدروكسيل) ومع مرور الوقت ترتبط هذه المجاميع تدريجياً وبالتالي تقل قدرة الشييتوزان على الأمتزاز.

تتباين كفاءة الشييتوزان على ازالة الصبغة اعتماداً على مصدر الشييتوزان ولاحظ (Ben Amor, et.al. 2023) في دراسة عزل فيها الشييتوزان من أنواع مختلفة من الحشرات أختلف في كفاءة الشييتوزان على ازالة صبغة المثلين الأزرق حيث بلغت أعلى نسبة 87.7 % للشييتوزان المعزول من Blaps lethifera وأقل نسبة للشييتوزان المعزول من Musca domestica اذ بلغت 10.3 %.



4-2-3-الفعالية المضادة للأكسدة Antioxidant activity

تم تحديد الفعالية المضادة للأكسدة للشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي باستخدام اختبار DPPH، والذي يعتمد على قياس قدرة المركبات على اصطياد الجذور الحرة . استخدمت تراكيز مختلفة من الشيتوزان (0, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100) $\mu\text{g/ml}$ وأظهرت النتائج (شكل 4-10) ان كل من شيتوزان الصبور والسمتي تمتلك فعالية مضادة للأكسدة تزداد مع زيادة التركيز.



شكل (4_10)

الفعالية المضادة للأكسدة للشيتوزان المعزول من قشور أسماك الصبور والسمتي .

نلاحظ ان لشيتوزان الصبور نشاط مضاد للأكسدة منخفض عند تركيز $1\mu\text{g/ml}$ بلغ 1.87 % و

ارتفعت هذه النسبة تدريجياً مع زيادة التركيز لتصل الى 7.22 % عند تركيز $100\mu\text{g/ml}$ ؛ وأظهر



شيتوزان السمتي سلوكاً مشابهاً عند تركيز $1\mu\text{g/ml}$ حيث بلغ نشاطه المضاد للأكسدة 1.87% الا انها تفوقت بشكل معنوي $P<0.05$ عن عينة الصبور اذ بلغ نشاطه 7.75% عند تركيز $100\mu\text{g/ml}$.

بشكل عام أظهرت النتائج ان كلا النوعين من الشيتوزان يمتلكان فعالية مضادة للأكسدة تزداد بزيادة التركيز وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل اليه (Wang, et.al. 2024) عند مقارنة النشاط المضاد للأكسدة للشيتوزان مع نشاط مشتقاته الذائبة في الماء وبتراكيز $(0, 2, 4, 6, 8, 10)\text{mg/ml}$ حيث لاحظ ارتفاع نشاط الشيتوزان تدريجياً مع زيادة التركيز وبلغ 25% عند تركيز 10mg/ml . كما ذكر Walk, et.al. (2014) ان النشاط المضاد للأكسدة للشيتوزان المعزول من قشور الروبيان بتركيز $500\mu\text{g/ml}$ بلغ 34% .

ان النشاط المضاد للأكسدة في الشيتوزان يرتبط ارتباط وثيق بوزنه الجزيئي حيث يزداد بانخفاض الوزن الجزيئي ويعود السبب في ذلك الى ان السلاسل الأقصر تكون أقل عرضة لتكوين الأواصر الهيدروجينية داخل الجزيء مما يؤدي الى زيادة نشاط مجاميع الهيدروكسيل والأمين في أفتناص الجذور الحرة (Sun, et.al. 2007) ومن جهة أخرى فأن درجة نزع الأستلة تلعب دور كبير في تحديد النشاط المضاد للأكسدة اذ ان زيادة نزع الأستلة يعني توفير مجاميع أمينية NH_2 أكثر في الشيتوزان والعكس صحيح (Wulandari, et.al. 2019).

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations



5-1 الاستنتاجات:

1. تم استخلاص الشيتوزان من مخلفات قشور اسماك الصبور والسمتي وبنسبة حاصل بلغ (29.55) % للسمتي و(16.56) % للصبور وبذلك يمكن اعتبار هذين النوعين من الاسماك مصدرا جيدا للشيتوزان.
2. يتمتع الشيتوزان المستخلص بصفات فيزيوكيميائية ممتازة من ناحية محتواه من الرماد والرطوبة والبروتين واللزوجة والوزن الجزيئي.
3. اثبتت الفحوصات المخبرية والتحليل الطيفية FTIR والمورفولوجية SEM وحيود الاشعة السينية XRD بصمة الشيتوزان.
4. ساعدت الصفات اعلاه في زيادة صفات الشيتوزان الوظيفية والحيوية حيث اظهر قابلية عالية على ربط الماء والدهن واطهر نشاطا عاليا كمادة مضادة للأكسدة.
5. اظهر شيتوزان السمتي قدرة عالية على تثبيط نمو كل من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام بينما اظهر شيتوزان الصبور قدرة على تثبيط نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام بينما اظهرت البكتريا الموجبة لصبغة كرام مقاومة لتأثيره المثبط.
6. كل هذه الصفات تجعل من شيتوزان قشور اسماك الصبور والسمتي مصدر مهم يمكن ادخاله في الكثير من التطبيقات الصناعية، الغذائية والدوائية.



5-2 التوصيات :

1. دراسة امثلة ظروف استخلاص الشيتوزان من قشور أسماك الصبور والسمتي.
2. دراسة فعالية الشيتوزان المستخلص على تثبيط نمو أنواع أخرى من البكتريا والفطريات ودراسة تأثيره المناعي وخصائصه المضادة للسرطان .
3. دراسة استخلاص الشيتوزان ومركبات فعالة بيولوجيا أخرى من مخلفات قشور أنواع أخرى من الاسماك المحلية.
4. دراسة إنتاج مركبات شيتوزان نانوية ودراسة فعاليتها الحيوية .
5. دراسة إمكانية تحويل الشيتوزان المحلية كيميائيا أو إنزيميا ودراسة تطبيقاتها الحيوية .

المصادر



المصادر العربية والاجنبية

أولاً- القرآن الكريم.

المصادر العربية والاجنبية

بايزيد، سمية، بن عمر، قدرية، غربي، نبيلة، مروة، معامير، وزغدي، شروق (2023) طرق صديقة للبيئة لتحضير وتوصيف الكايتين والكيروزان من فطر *Agaricus bisporus* - تطبيقات صناعية- جامعة الشهيد حمه لخضر -الوادي، كلية التكنولوجيا ، الجزائر.

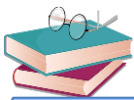
Abdul Hadi, R. L., & Mohammad, A. K. (2024). The removal of methylene blue dye from industrial wastewater by using chitosan. *Passer Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(Special Issue), 71–83.

Abdulmajid, Z., Abbas, A., & Al-Zuhair, S. (2022). Biological extraction of chitin and chitosan using fermentation technology and its applications: A review. *Journal of Cleaner Production*, 371, 133621. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133621>.

Abdul Mottalib, M. A., Islam, M. H., Dhar, M. C., Akhtar, K., & Goni, M. A. (2024). Preparation and characterization of new biodegradable packaging materials based on gelatin extracted from *Tenualosa ilisha* fish scales with cellulose nanocrystals. *ACS Omega*, 9(52), 51175–51190. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c07015>.

Abed-Al-Kareem, A.H., Jasim, M.A., & Ali, A.J. (2017). Isolation and characterization of chitosan from shrimp shell and study physicochemical and functional properties. University of Thi-Qar *Journal of Agriculture Research. Sciences Research*, 6 (1), 52–65.

Abirami, S., Nagarajan, D., Antony, V., Mini, V. A., Sugasini, A., & Daniel, A. A. (2020). Extraction, characterization, and utilization of shrimp waste chitin-derived chitosan in antimicrobial activity, seed germination, preservative, and



microparticle formulation. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(2), 8725–8739. <https://doi.org/10.33263/BRIAC112.87258739>.

Abo Elsoud, M. M., & El Kady, E. M. (2019). Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0105-y>.

Aichayawanich, S., & Saengprapaitip, M. (2019a). Isolation and characterization of chitosan from fish scale waste. *Earth and Environmental Science: The 12th TSAE International Conference*, 301, 012051. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/301/1/012051>.

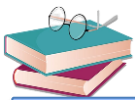
Aichayawanich, S., & Saengprapaitip, P. (2019b). Effect of deacetylation degree on the properties of chitosan extracted from shrimp shells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 564–570.

Al Sagheer, F. A., Al-Sughayer, M. A., Muslim, S., & Elsabee, M. Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 410–419.

Ali, A., Ferdosi, F. H., Sarwar, M., Anjum, S., Mushtaq, Z., Liaquat, M., Abbas, M. T., Anees, M., Tariq, M. R., & Ashraf, M. I. (2025). Inducing salt stress tolerance in bitter melon (*Momordica charantia*) through seed treatment with chitosan. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1525561. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1525561>

Aljawish, A. (2013). Fonctionnalisation enzymatique de chitosane par des composés phénoliques: Évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères. *Thèses, Université De Lorraine*, 31, 35.

Allwin, S. I. J., Immaculate Jeyasanta, K., & Patterson, J. (2015). Extraction of chitosan from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste and



examination of its bioactive potentials. *Advances in Biological Research*, 9(6), 389–396. <https://doi.org/10.5829/idosi.2015.9.6.96183>.

Alrman, K.H.; Alhariri, S. & Bakri, I. 2023. Optimization of conditions for isolating Chitin from fish scale waste (Tilapia) based on chemical treatment. *Damascus Univ. J. for the Basic Sci.*, 39(3): 21-37.

Amery, A. H. A., Al-Tai, M. A. J., & Al-Saad, A. J. A. (2017). Extraction of chitosan from shrimp shells and study of its physicochemical and functional properties [In Arabic]. *Thi-Qar University Journal for Agricultural Research*, 6(1), 52–65. Retrieved from <https://search.emarefa.net/detail/BIM-885469>.

Anggraeni, A. S., Jayanegara, A., Laconi, E. B., Kumalasari, N. R., Windarsih, A., & Sofyan, A. (2024). Physicochemical and antibacterial properties of chitosan extracted from swimming crab shells and wooden grasshoppers using different extraction methods. *Food Research*, 8(3), 439–450. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.8\(3\).313](https://doi.org/10.26656/fr.2017.8(3).313).

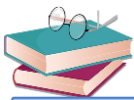
Aranaz, I.; Alcantara, A.; Civera, M.; Arias, C.; Elorza, B.; Heras Caballero, A.; Acosta, N. 2021. Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers*; (13)19:3256. <https://doi.org/10.3390/polym13193256>.

Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., & Amrane, A. (2013). Chitin extraction from crustacean shells using biological methods – A review. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 12–25.

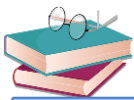
Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2019). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (21st ed.). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.



- Bajer, D., & Kaczmarek, H. (2022). Thermal stability of fluorescent chitosan modified with heterocyclic aromatic dyes. *Materials*, 15, 3667. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma15103667>
- Bashiri, R., Akbari, M., Zohdi, H., & Hashemi, M. (2025). Enhanced deacetylation of chitin extracted from fish scales using optimized alkali treatment for biomedical-grade chitosan. *Journal of Marine Bioproducts Research*, 8(1), 33–42.
- Bastiaens, L.; Soetemans, L.; Dhondt, E. & Elst, K. 2019. Sources of Chitin and Chitosan and their isolation. In: *Chitin and Chitosan: Preparation and Applications*. Wiley, p. 1-34.
- Begum, M., Al Mamun, Z. U., & Miah, A. S. (2021). Nutritional profiling of selected fish's scales: An approach to determine its prospective use as a biomaterial. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 9(3), 26–31.
- Bellouti, F., & Hadj Djilani, S. (2018). Preparation of chitosan from shrimp shells: Study and characterization. (Master's thesis, Djilali Bounaama University, Khemis Miliana).
- Ben Amor, I., Hemmami, H., Laouini, S. E., Zeghoud, S., Benzina, M., Achour, S., Naseef, A., Alsalmé, A., & Barhoum, A. (2023a). Use of insect-derived chitosan for the removal of methylene blue dye from wastewater: Process optimization using a central composite design. *Materials*, 16(14), 5049. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma16145049>
- Ben Amor, I.; Hemmami, H., Laouini, S. E., Abdelaziz, A. G., & Barhoum, A. (2023b). Influence of chitosan source and degree of deacetylation on antibacterial activity and adsorption of AZO dye from water. *Biomass Conversion and Biorefinery*; 14: 16245-16255. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-03741-9>



- Benazouz, K., Bouchelkia, N., Imessaoudene, A., Bollinger, J., Amrane, A., Assadi, A. A., Zeghioud, H., & Mouni, L. (2023). Efficient and low-cost water remediation for chitosan derived from shrimp waste, an ecofriendly material: Kinetics modeling, response surface methodology optimization, and mechanism. *Water*, MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/w15213728>
- Bertrand, M.; Simonin, S. & Bach, B. 2024. Application of Chitosan in the agri-food sector: A review. *Carbohydrate Research*. 543: 109219. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2024.109219>
- Cardenas-Triviño, G., & Soto-Seguel, R. (2020). Chitosan composites preparation and characterization of guide tubes for nerve repair. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 65(3), 4870–4878.
- Casadidio, C., Peregrina, D. V., Gigliobianco, M. R., Deng, S., Censi, R., & Di Martino, P. (2019). Chitin and chitosans: Characteristics, eco-friendly processes, and applications in cosmetic science. *Marine Drugs*, 17(6), 369. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md17060369>
- Chattopadhyay, D. P., & Inamdar, M. S. (2010). Aqueous behaviour of chitosan. *International Journal of Polymer Science*, (1), 939536. <https://doi.org/10.1155/2010/939536>.
- Che, X., Zhao, T., Hu, J., Yang, K., Ma, N., Li, A., Sun, Q., Ding, C., & Ding, Q. (2024). Application of chitosan-based hydrogel in promoting wound healing: A review. *Polymers* MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym16030344>
- Cheng, J., Zhu, H., Huang, J., Zhao, J., Yan, B., Ma, S., Zhang, H., & Fan, D. (2020). The physicochemical properties of chitosan prepared by microwave heating. *Food Science & Nutrition*, 8(4), 1987–1994. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1486>
- Chenite, A., Buschmann, M., Wang, D., Chaput, C., & Kandani, N. (2001). Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate



solutions. *Carbohydrate Polymers*, 46(1), 39–47.
[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00281-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00281-2)

Chobot, V., Kremenak, J., & Opletal, L. (1995). Phytotherapeutic aspects of diseases of the circulatory system. 4. chitin and chitosan. *Ceska a Slovenska Farmacie: Casopis Ceske Farmaceuticke Spolecnosti a Slovenske Farmaceuticke Spolecnosti*, 44(4), 190–195.

Choi, C., Nam, J., & Lee, S. (2023). Advances in low molecular weight chitosan: Preparation, characterization and biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 305, 120555. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120555>.

Coppola, D., Lauritano, C., Palma Esposito, F., Riccio, G., Rizzo, C., & De Pascale, D. (2021). Fish waste: From problem to valuable resource. *Marine Drugs*, 19 (2),116, MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md19020116>

Crini, G., & Lichtfouse, E. (2019). Chitin and chitosan: Applications in food, agriculture, pharmacy, medicine and wastewater treatment. *Sustainable Agriculture Reviews*; 36. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16581-9>

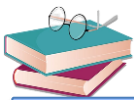
Dongre, R. S. (2019). Chitosan formulations: Chemistry, characteristics and contextual adsorption in unambiguous modernization of S&T. In *Hysteresis of composites* (pp. 147–163).

Doval, R.R.; Arellanes, S.P.; Barajas, A.Y.; Sanchez, A.G. & Lazcano, A.A. 2023. Chitosan: Properties and Its Application in Agriculture in Context of Molecular Weight (Review). *Polymers*; 15, 2867. <https://doi.org/10.3390/Polym15132867>.

Dutta, P. K. (2016). Chitin and chitosan for regenerative medicine. Springer India. pp 122-288.



- El Knidri, H., Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A., & Lahsini, A. (2018). Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1181–1189. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139>
- Elhaes, H., Ezzat, H. A., Ibrahim, A., Samir, M., Refaat, A., & Ibrahim, M. A. (2024). Spectroscopic, Hartree–Fock and DFT study of the molecular structure and electronic properties of functionalized chitosan and chitosan-graphene oxide for electronic applications. *Optical and Quantum Electronics*, 56(3), 458. <https://doi.org/10.1007/s11082-023-05978-0>
- Elieh-Ali-Komi, D., & Hamblin, M. R. (2016). Chitin and Chitosan: Production and application of versatile biomedical nanomaterials. *International Journal of Advanced Research*, 4(3), 411-427, available in PMC 2017 March 01.
- Fernández-Mimbrera, M. Á, Salido, S., Marchal, J. A., & Alejo-Armijo, A. (2024). Tracking selective internalization and intracellular dynamics of modified chitosan polymeric micelles of interest in primary hyperoxaluria diseases. *American Chemical Society* 9, 39503-39512. (ACS) Omega. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c03415>
- Hamed, I., Özogul, F., & Regenstein, J. M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.007>
- Hasnain, MS.; Beg, B. & Nayak, AK. 2021. Chitosan in drug delivery. Academic Press: Cambridge, MA, USA; Elsevier b.
- Hassainia, A. (2018). Obtention du biopolymère (chitine) à partir du champignon (*Agaricus bisporus*): Extraction et caractérisation. (Doctoral dissertation, Université 8 mai 1945 Guelma).



- Hassan, A. F., Ahmed, A. S., & Salem, A. A. (2021). Extraction and characterization of chitosan from crab and shrimp shells. *Egyptian Journal of Chemistry*, 64(2), 781–792.
- Hassan, L. S., Abdullah, N., Abdullah, S., Ghazali, S. R., Sobri, N., Hashim, N., Yahya, N., & Muslim, W. (2022). The effectiveness of chitosan extraction from crustaceans' shells as a natural coagulant. Paper presented at the *Journal of Physics: Conference Series*, , 2266(1) 012002. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2266/1/012002>.
- Hélène, L. & Lauzon, R. 2015. Chitosan: A marine dietary fiber to fight lifestyle related diseases. NBR Vol. 2 (4).
- Hemmami, H., Ben Amor, I., Ben Amor, A., Zeghoud, S., Ahmed, S., & Alnazza Alhamad, A. (2024). Chitosan, its derivatives, sources, preparation methods, and applications: A review. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 11(1), 341–364. <https://doi.org/10.18596/jotcsa>.
- Hongpattarakere, T., & Riyaphan, O. (2008). Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosans prepared from carapace of black tiger shrimp. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 30(1): 1-9. <http://www.sjst.psu.ac.th/>
- Hosseinnejad, M., & Jafari, S. M. (2016). Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85,467–475. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>.
- Hu, S., Wang, Y., Wen, X., Wang, L., Jiang, Z., & Zheng, C. (2018). Effects of low-molecular-weight chitosan on the growth performance, intestinal morphology, barrier function, cytokine expression and antioxidant system of weaned piglets. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 215. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1543-8>



- Huang, Y., & Tsai, Y. (2020). Extraction of chitosan from squid pen waste by high hydrostatic pressure: Effects on physicochemical properties and antioxidant activities of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.252>
- Huet, G., Hadad, C., Husson, E., Laclef, S., Lambertyn, V., Araya Farias, M., Jamali, A., Courty, M., Alayoubi, R., Gosselin, I., Sarazin, C., & Van Nhien, A. N. (2020). Straightforward extraction and selective bioconversion of high purity chitin from bombyx eri larva: Toward an integrated insect biorefinery. *Carbohydrate Polymers* 15: 228. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115382>
- Ideia, P., Pinto, J., Ferreira, R., Figueiredo, L., Spínola, V., & Castilho, P. C. (2020). Fish processing industry residues: A review of valuable products extraction and characterization methods. *Waste and Biomass Valorization*, 11(7), 3223–3246. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00739-1>
- Islam, M. M., Masum, S. M., Rahman, M. M., Molla, M. A. I., Shaikh, A. A., & Roy, S. K. (2011). Preparation of chitosan from shrimp shell and investigation of its properties. *International Journal of Basic & Applied Sciences*, 11(1), 116–130.
- Islam, S., Arnold, L., & Padhye, R. (2015). Comparison and characterisation of regenerated chitosan from 1-butyl-3-methylimidazolium chloride and chitosan from crab shells. *BioMed Research International*, 2015, 874316. Wiley. <https://doi.org/10.1155/2015/874316>
- Islam, S., Bhuiyan, M. A. R., & Islam, M. N. (2016). Chitin and chitosan: Structure, properties and applications in biomedical engineering. *Journal of*



Polymers and the Environment, Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0865-5>

Jaber, N., Al-remawi, M., Al-akayleh, F., Al-muhtaseb, N., Al-adham, I. S. I., & Collier, P. J. (2021). A review of the antiviral activity of chitosan, including patented applications and its potential use against COVID-19. *Journal of Applied Microbiology*, (132)1:41-58. Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1111/jam.15202>

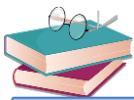
Jiménez-Gómez, C. P., & Cecilia, J. A. (2020). Chitosan: A natural biopolymer with a wide and varied range of applications. *Molecules*, 25:3981. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25173981>

John Kasongo, K., Tubadi, D. J., Bampole, L. D., Kaniki, T. A., Kanda, N. J. M., & Lukumu, M. E. (2020). Extraction and characterization of Chitin and Chitosan from *Termitomyces titanicus*. *SN Applied Sciences*, 2(3): 406. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2186-5>.

Jucker, C., Lupi, D., Moore, C. D., Leonardi, M. G., & Savoldelli, S. (2020). Nutrient recapture from insect farm waste: Bioconversion with *hermetia illucens* (L.) (diptera: Stratiomyidae). *Sustainability*, 12, 362. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/su12010362>

Kaczmarek, M. B., Struszczyk-Swita, K., Li, X., Szczesna-Antczak, M., & Daroch, M. (2019). Enzymatic modifications of chitin, chitosan, and chitooligosaccharides. *Frontiers. Bioengineering. Biotechnology*, 7: 243. SA. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00243>

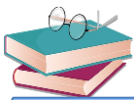
Kanwal, S., Bibi, S., Haleem, R., Waqar, K., Mir, S., Maalik, A., Sabahat, S., Hassan, S., Awwad, N. S., Ibrahim, H. A., & Alturaifi, H. A. (2024). Functional potential of chitosan-metal nanostructures: Recent developments and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 282, 136715. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136715>



- Kasaai, M. R. (2007). A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 71 (4), 497–508. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.07.009>
- Kasaai, M. R., Arul, J., & Charlet, G. (2000). Intrinsic viscosity–molecular weight relationship for chitosan. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 38(19), 2591–2598. [https://doi.org/10.1002/1099-0488\(20001001\)38:193.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1099-0488(20001001)38:193.0.CO;2-6)
- Kasongo, K. J., Tubadi, D. J., Bampole, L. D., Kaniki, T. A., Kanda, N. J. M., & Lukumu, M. E. (2020). Extraction and characterization of chitin and chitosan from *Termitomyces titanicus*. *SN Applied Sciences*, 2, 406–414. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2186-5>.
- Kulikov, S.N.; Chirkov, S.N.; Ilina, A.V.; Lopatin, S.A. & Varlamov, V.P. 2006. Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants; *Appl. Biochem. Microbiol.* (42):200-203. <https://doi/10.1134/S0003683806020165>.
- Kumar, S., Sharma, R., & Patel, D. (2023). Chitosan as a versatile carrier in targeted drug delivery: A comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutics*, 634, 122475. <https://doi.org/10.xxxx/ijpharm-xxxx>.
- Kumari, S.; Rath, P. & Kumar, A. 2016. Chitosan from shrimp shell (*Crangon crangon*) and fish scales (*Labeorohita*): Extraction and characterization. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 15(24): 1258 -1268. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.15138>.
- Kumari. S. & Rath, P.K. 2014. Extraction and characterization of Chitin and Chitosan from *Labeo rohita* fish scales. *Proccdia Material Science*, 6:482-489. www.sciencedirect.com.



- Kumari, S.; Rath, P.; Kumarb, A.S.H. & Tiwari, T.N. 2015. Extraction and characterization of Chitin and Chitosan from fishery waste by chemical method. *Environmental Technology & Innovation*. 3: 77-85. <https://dx.doi.org/10.1016/j.eti.2015.01.002>.
- Li, Q., Dunn, E. T., Grandmaison, E. W., & Goosen, M. F. A. (1992). Applications and properties of chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 7(4), 370–397.
- Li, X., Zhang, Y., & Huang, J. (2025). Improving chitosan solubility using high hydrostatic pressure: A green processing approach. *Journal of Food Engineering*, 340, 111234.
- Lin, Y., Cai, X., Wu, X., Lin, S., & Wang, S. (2019). Fabrication of snapper fish scales protein hydrolysate-calcium complex and the promotion in calcium cellular uptake. *Journal of Functional Foods*. 65: 103717 Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103717>
- Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C., & Yang, Q. (2012). Extraction and characterization of chitin from the beetle holotrichia parallela motschulsky. *Molecules*; (17): 4604-4611. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules17044604>
- Maktoof, A. A., Elherarlla, R. J., & Ethaib, S. (2020). Identifying the nutritional composition of fish waste, bones, scales, and fins. IOP Conference Series: *Materials Science and Engineering*, 871, 012013. IOP Publishing <https://doi.org/10.1088/1757-899X/871/1/012013>.
- Maleki, S., Shamloo, A., & Kalantarnia, F. (2022). Tubular TPU/SF nanofibers covered with chitosan-based hydrogels as small-diameter vascular grafts with enhanced mechanical properties. *Scientific Reports* 12, 6179. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10264-2>



Mansuri, S., Kesharwani, P., Jain, K., Tekade, R. K., & Jain, N. K. (2016). Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive and Functional Polymers*;100: 151-172. Elsevier

BV. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.01.011>

Martín-López, H., Pech-Cohuo, S. C., Herrera-Pool, E., Medina-Torres, N., Cuevas-Bernardino, J. C., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Ramos-Díaz, A., Trombotto, S., & Pacheco, N. (2020). Structural and physicochemical characterization of chitosan obtained by UAE and its effect on the growth inhibition of pythium ultimum. *Agriculture*,10, 464. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100464>

Matica, M. A., Aachmann, F. L., Tøndervik, A., Sletta, H., & Ostafe, V. (2019). Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5889 MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20235889>

Matouri, M., Liu, Z., & Saldaña, M. D. A. (2024). Production of chitosan from shrimp shell using ultrasound followed by subcritical water hydrolysis. *Food Chemistry*, 441, 138248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138248>

Minh, N. C., Van Hoa, N., & Trung, T. S. (2020). Preparation, properties, and application of low-molecular-weight chitosan. *In Handbook of chitin and chitosan*. Vol 1. pp. 453-471. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817970-3.00015-8>

Mohanasrinivasan, V., Mishra, M., Paliwal, J. S., Singh, S. K., Selvarajan, E., Suganthi, V., & Subathra Devi, C. (2013). Studies on heavy metal removal efficiency and antibacterial activity of chitosan prepared from shrimp shell waste. *3 Biotechnology*, 4, 167–175. Springer . <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0140-6>



- Mulatsari, E., Mumpuni, E., Qodriah, R., Budiati, A., Gunawan, J., Soeroso, M. H., & Serlahwaty, D. (2022). Synthesis and characterization of chitosan from crab shell waste and its applications as edible coating. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 14(3), 13–17. [. https://doi.org/10.22159/ijap.2022.v14s3.02](https://doi.org/10.22159/ijap.2022.v14s3.02)
- Mumtaz, M., Hussain, N., Salam, S., Azam, H. M. H., Łukasik, N., Kim, T. H., Santos, J. C. S. D., & Schmidt, J. E. (2024). Chitosan-based nanomaterials for removal of water pollutants. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-21891-0.00016-0>
- Nagy, V. (2018). Chitosan-natural antioxidant conjugates: Synthesis, antimicrobial and antioxidant properties (Master's thesis). University of Iceland, Faculty of Pharmaceutical Sciences; School of Health Sciences.
- Nelluri, P., Kumar Rout, R., Kumar Tammineni, D., Joshi, T. J., & Sivaranjani, S. (2024). Technologies for management of fish waste & value addition. *Food and Humanity*, 2, 100228. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2024.100228>
- Nessa, F., Shah, M. D., Masum, M., Asaduzzaman, S. K., & Roy, A. (2010). Process for the preparation of chitin and chitosan from prawn shell waste. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 45(4), pp.323–330. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v45i4.7330>
- Nikhitha, V. (2023). Experimental procedures of different methods for extraction of Chitin from shrimp shells. *International Journal of Novel Research and Development IJNRD*, 8(10): 816-827. www.ijnrd.org.
- No, H.K.; Lee, K.S. & Meyers, S.P. 2000. Correlation between physiochemical characteristics and binding capacities of Chitosan products. *Journal of Food Science*; 65(7): 1134-1137. <https://doi:10.1111/j.1365-2621.2000.tb10252.x>
- Öğretmen, Ö Y., Karsli, B., & Çağlak, E. (2022). Extraction and physicochemical characterization of chitosan from pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*)



shell wastes. Ankara University Faculty of Agriculture. *Journal of Agricultural Sciences*, 28(3), 490–500 <https://doi.org/10.15832/ankutbd.861909>

Padhi, S., Behera, A., Hasnain, M. S., & Nayak, A. K. (2022). Chapter 7 - chitosan-based drug delivery systems in cancer therapeutics. In M. S. Hasnain, S. Beg & A. K. Nayak (Eds.), *Chitosan in drug delivery* (pp. 159–193). Academic Press.Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819336-5.00011-X>

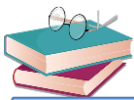
Panith, N., Wichaphon, J., Lertsiri, S., & Niamsiri, N. (2016). Effect of physical and physicochemical characteristics of chitosan on fat-binding capacities under in vitro gastrointestinal conditions. *LWT- Food Science and Technology*. 71: 25-32. Elsevier

BV. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.013>

Pech-Cohuo, S. C., Martín-López, H., Uribe-Calderón, J., González-Canché, N. G., Salgado-Tránsito, I., May-Pat, A., Cuevas-Bernardino, J. C., Ayora-Talavera, T., Cervantes-Uc, J. M., & Pacheco, N. (2022). Physicochemical, mechanical, and structural properties of bio-active films based on biological-chemical chitosan, a novel ramon (*Brosimum alicastrum*) starch, and quercetin. *Polymers*, 14 (7), 1346. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym14071346>

Qin, D., Bi, S., You, X., Wang, M., Cong, X., Yuan, C., Yu, M., Cheng, X., & Chen, X. (2022). Development and application of fish scale wastes as versatile natural biomaterials. *Chemical Engineering Journal*, 428, 131102. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131102>

Rasweefali, M. K., Sabu, S., Muhammed Azad, K. S., Raseel Rahman, M. K., Sunooj, K. V., Sasidharan, A., & Anoop, K. K. (2022). Influence of deproteinization and demineralization process sequences on the



physicochemical and structural characteristics of chitin isolated from deep-sea mud shrimp (*Solenocera hextii*). *Advances in Biomarker Sciences and Technology*, 4, 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.abst.2022.03.001>

Raza, Z. A., Khalil, S., Ayub, A., & Banat, I. M. (2020b). Recent developments in chitosan encapsulation of various active ingredients for multifunctional applications. *Carbohydrate Research*, 492, 108004. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108004>

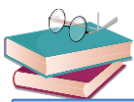
Román-Doval, R., Torres-Arellanes, S. P., Tenorio-Barajas, A. Y., Gómez-Sánchez, A., & Valencia-Lazcano, A. A. (2023). Chitosan: Properties and its application in agriculture in context of molecular weight. *Polymers*, 15(13), 2867. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym15132867>

Salindeho, N., Mokolensang, J. F., Manu, L., Taslim, N. A., Nurkolis, F., Gunawan, W. B., Yusuf, M., Mayulu, N., & Tsopmo, A. (2022). Fish scale rich in functional compounds and peptides: A potential nutraceutical to overcome undernutrition. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1072370. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1072370>

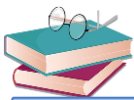
Şavkan, A. N., & Çandar, A. (2024). The effects of chitosan applications on seed germinating and early seedling period of red beet (*Beta vulgaris* L.) under salty conditions. *International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research*, 8(4), 277–288. <https://doi.org/10.29329/ijjaar.2024.1109.1>

Schäfer, H. L., Gandras, L., Schneider, L., Witthohn, M., Troidl, K., Muffler, K., & Weiss, C. K. (2025). Analysis, properties, and applications of insect-derived chitosan: A sustainable path to functional polysaccharide materials.

(Review). *gels*, 11 (4), 291. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/gels11040291>



- Seenuvasan, M., Sarojini, S., & Dineshkumar, B. (2020). Isolation and characterization of chitosan from shrimp shell waste. *International Journal of Scientific and Technology Research*, 9(3), 4723–4728.
- Shahadha, A. F., Al-Aubadi, I. M., & Merzah, N. R. (2023). Preparation of chitosan from agaricus bisporus brown stems and studying some its physicochemical and functional properties. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1259/1/012070>
- Sharif, R., Mujtaba, M., Ur Rahman, M., Shalmani, A., Ahmad, H., Anwar, T., Tianchan, D., & Wang, X. (2018). The multifunctional role of chitosan in horticultural crops; A review. *Molecules* 2018, 23(4), 872. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules23040872>
- Silva, M. B. d. O., de Oliveira, S. A., & Rosa, D. d. S. (2024). Comparative study on microwave-assisted and conventional chitosan production from shrimp shell: Process optimization, characterization, and environmental impacts. *Journal of Cleaner Production*, 440, 140726. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2024.140726>
- Singh, R., Shitiz, K., & Singh, A. (2017). Chitin and chitosan: Biopolymers for wound management. *International Wound Journal*, 14(6), 1276–1289. Wiley. <https://doi.org/10.1111/iwj.12797>
- Sogias, I. A., Williams, A. C., & Khutoryanskiy, V. V. (2008). Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, 9 (7), 1837–1842. American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/bm800276d>
- Sun, T., Zhou, D., Mao, F., & Zhu, Y. (2007). Preparation of low-molecular-weight carboxymethyl chitosan and their superoxide anion scavenging activity. *European Polymer Journal*, 43(2), 652–656. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2006.11.014>



- Suresh, S., Umesh, M., & Santosh, A. S. (2024). Biological extraction of chitin from fish scale waste using proteolytic bacteria *Stenotrophomonas koreensis* and its possible application as an active packaging material. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(22), 29023–29033. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-03865-y>
- Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. A. Q. (1997). Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chemistry*, 60(4), 605–610. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00039-3)
- Thomas, S., Pius, A., & Gopi, S. (2020). Handbook of chitin and chitosan: Volume 1: Preparation and properties. Elsevier.
- Economic and Social Council. 2018. Special edition: Progress towards the sustainable development goals. United Nations, <https://docs.org/E/2019/68>.
- Vandeveld, K., & Kiekens, P. (2004). Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ^{13}C NMR. *Carbohydrate Polymers*, 58(4), 409–416. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.08.004>
- Varma, R., & Vasudevan, S. (2020). Extraction, characterization, and antimicrobial activity of chitosan from horse mussel *Modiolus modiolus*. American Chemical Society (ACS). *Omega*, 5(32), 20224–20230. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01903>
- Vigneshwari, S., & Gokula, V. (2018). Extraction and FTIR characterization of chitosan from *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) shell wastes. *International Journal of Advanced Scientific Research and Management*, 3(10).
- Walke, S., Srivastava, G., Nikalje, M., Doshi, J., Kumar, R., Ravetkar, S., & Doshi, P. (2014). Physicochemical and functional characterization of chitosan prepared from shrimp shells and investigation of its antibacterial, antioxidant



and tetanus toxoid entrapment efficiency. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 26(2), 215–225.

Wang, W., Meng, Q., Li, Q., Liu, J., Zhou, M., Jin, Z., & Zhao, K. (2020). Chitosan derivatives and their application in biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(2), 487. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21020487>

Wang, Z., Yan, Y., Zhang, Z., Li, C., Mei, L., Hou, R., Liu, X., & Jiang, H. (2024). Effect of chitosan and its water-soluble derivatives on antioxidant activity. *Polymers*, 16(7), 867. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym16070867>

Wolkers, W. F., Oliver, A. E., Tablin, F., & Crowe, J. H. (2004). A fourier-transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. *Carbohydrate Research*, 339(6), 1077–1085. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.01.016>

Fatima, B. (2020) Quantitative Analysis by IR: Determination of Chitin/

Chitosan DD. Selection of our books indexed in the book citation index in web of science™ core collection (BKCI). <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.89708>

Wulandari, W. T., Puspitasari, R., & Aprilia, A. Y. (2020). Antioxidant activity of chitosan from the waste of green mussels shell (*Perna viridis* L). Paper presented at the 2nd Bakti Tunas Husada-Health Science International Conference (BTH-HSIC 2019), 33–35

Yadav, M., Kaushik, B., Rao, G. K., Srivastava, C. M., & Vaya, D. (2023). Advances and challenges in the use of chitosan and its derivatives in biomedical fields: A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 5, 100323. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100323>



- Yamaura, K., Mifune, Y., Inui, A., Nishimoto, H., Mukohara, S., Yoshikawa, T., Shinohara, I., Kato, T., Furukawa, T., Hoshino, Y., Matsushita, T., & Kuroda, R. (2022). Novel therapy using a fish scale collagen scaffold for rotator cuff healing in rat models. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 31(12), 2629–2637. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2022.06.024>
- Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13(3), 1133–1174. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md13031133>
- Younes, I., Sellimi, S., Rinaudo, M., Jellouli, K., & Nasri, M. (2014). Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 57–63. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.029>
- Yuan, Y., Chen, L., Shi, W., Wang, Z., & Zhang, H. (2020). Insight into Physicochemical, Rheological, and Antibacterial Properties of Chitosan Extracted from *Antarctic krill*: A Comparative Study. *Molecules*, 25(18), 4074. <https://doi.org/10.3390/molecules25184074>
- Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. (2015). A review on chitin and chitosan polymers: Structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *Chemical Biology Engineering Reviews*. 1-24. Wiley. <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>

الملاحق



ملحق (1)
VITEK 2
لبكتريا Staphylococcus و E. coli

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed December 11, 2024 7:43:45 AM CST

Patient Name: sona jaber . .
Location:
Lab ID: 59

Patient ID: 59
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli

Source: urine

Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time: 4.87 hours	Status: Final
Selected Organism	98% Probability Bionumber: 0405611140565211	Escherichia coli
ID Analysis Messages		

Susceptibility Information	Analysis Time: 17.80 hours	Status: Final
----------------------------	----------------------------	---------------

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Ampicillin	>= 32	R	Amikacin	32	I
Cefazolin	>= 64	R	Gentamicin	4	*I
Cefoxitin	>= 64	R	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	>= 64	R	Levofloxacin	>= 8	R
Ceftriaxone	>= 64	R	Tigecycline	<= 0.5	S
Cefepime	>= 64	R	Nitrofurantoin	>= 512	R
Ertapenem	2	S	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	>= 320	R
Meropenem	0.5*	*I			

**= AES modified **= User modified

AES Findings	
Confidence:	Consistent with correction



bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed June 22, 2025 7:59:24 AM CDT

Patient Name: marwa majed yaseen ,
Location:
Lab ID: 755

Patient ID: 755
Physician:
Isolate Number: I

Organism Quantity:
Selected Organism : Staphylococcus aureus

Source: vaginal swab

Collected:

Comments:

Identification Information	Analysis Time: 5.85 hours	Status: Final
Selected Organism	Staphylococcus aureus	
ID Analysis Messages		

Susceptibility Information	Analysis Time: 10.97 hours	Status: Final
----------------------------	----------------------------	---------------

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Benzylpenicillin	>= 0.5	R	Teicoplanin	8	S
Oxacillin	>= 4	R	Vancomycin	4	I
Gentamicin	4	*R	Tetracycline	>= 16	R
Tobramycin	2	*R	Tigecycline	0.5	S
Levofloxacin	2	I	Nitrofurantoin	32	S
Moxifloxacin	0.5	S	Fusidic Acid	16	R
Erythromycin	>= 8	R	Rifampicin	1	*R
Clindamycin	4	R	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	<= 10	S

*= AES modified **= User modified

AES Findings	
Confidence:	Consistent





Univariate Analysis of Variance

Notes		
Output Created		
30-JUN-2025 11:10:15		
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	108
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax		
UNIANOVA AntibacterialActivity BY A Bacteria ChitosanConc /METHOD=SSTYPE(3) /INTERCEPT=INCLUDE /EMMEANS=TABLES(A) COMPARE ADJ(LSD) /EMMEANS=TABLES(Bacteria) COMPARE ADJ(LSD) /EMMEANS=TABLES(ChitosanConc) COMPARE ADJ(LSD) /EMMEANS=TABLES(A*Bacteria) compare (Bacteria) ADJ(LSD) /EMMEANS=TABLES(A*ChitosanConc) compare (ChitosanConc) ADJ(LSD) /EMMEANS=TABLES(Bacteria*ChitosanConc) compare (Bacteria) ADJ(LSD) /EMMEANS=TABLES(A*Bacteria*ChitosanC onc) compare (Bacteria) ADJ(LSD) /PRINT DESCRIPTIVE /CRITERIA=ALPHA(.05) /DESIGN=A Bacteria ChitosanConc A*Bacteria A*ChitosanConc Bacteria*ChitosanConc A*Bacteria*ChitosanConc.		
Resources	Processor Time	00:00:00.03
	Elapsed Time	00:00:00.03



Descriptive Statistics

Dependent Variable: Antibacterial Activity

A	Bacteria	Chitosan Conc	Mean	Std. Deviation	N
a1	b1	c1	19.67	.577	3
		c2	18.00	2.000	3
		c3	15.33	.577	3
		c4	17.00	2.646	3
		c5	13.67	1.528	3
		c6	.00	.000	3
		Total	13.94	6.830	18
	b2	c1	17.67	2.082	3
		c2	16.33	1.155	3
		c3	.00	.000	3
		c4	.00	.000	3
		c5	.00	.000	3
		c6	.00	.000	3
		Total	5.67	8.296	18
	Total	c1	18.67	1.751	6
		c2	17.17	1.722	6
		c3	7.67	8.406	6
		c4	8.50	9.460	6
		c5	6.83	7.548	6
		c6	.00	.000	6
		Total	9.81	8.585	36
a2	b1	c1	19.33	.577	3
		c2	18.33	2.082	3
		c3	16.67	1.528	3
		c4	15.33	.577	3
		c5	15.00	1.000	3
		c6	14.33	2.082	3
		Total	16.50	2.229	18
	b2	c1	.00	.000	3
		c2	.00	.000	3
		c3	.00	.000	3
		c4	.00	.000	3
		c5	.00	.000	3
		c6	.00	.000	3
		Total	.00	.000	18
Total	c1	9.67	10.596	6	
	c2	9.17	10.128	6	



		c3	8.33	9.180	6
		c4	7.67	8.406	6
		c5	7.50	8.240	6
		c6	7.17	7.960	6
		Total	8.25	8.510	36
a3	b1	c1	19.67	.577	3
		c2	18.00	3.464	3
		c3	16.00	1.000	3
		c4	15.33	.577	3
		c5	13.33	3.055	3
		c6	12.67	2.517	3
		Total	15.83	3.130	18
	b2	c1	15.67	.577	3
		c2	15.33	.577	3
		c3	15.00	1.732	3
		c4	14.00	1.732	3
		c5	14.00	.000	3
		c6	11.67	2.887	3
		Total	14.28	1.904	18
	Total	c1	17.67	2.251	6
		c2	16.67	2.658	6
		c3	15.50	1.378	6
		c4	14.67	1.366	6
		c5	13.67	1.966	6
		c6	12.17	2.483	6
		Total	15.06	2.672	36
Total	b1	c1	19.56	.527	9
		c2	18.11	2.261	9
		c3	16.00	1.118	9
		c4	15.89	1.616	9
		c5	14.00	1.936	9
		c6	9.00	6.982	9
		Total	15.43	4.571	54
	b2	c1	11.11	8.448	9
		c2	10.56	7.955	9
		c3	5.00	7.550	9
		c4	4.67	7.053	9
		c5	4.67	7.000	9
		c6	3.89	6.009	9
		Total	6.65	7.638	54
Total	Total	c1	15.33	7.252	18



c2	14.33	6.877	18
c3	10.50	7.710	18
c4	10.28	7.614	18
c5	9.33	6.920	18
c6	6.44	6.845	18
Total	11.04	7.661	108

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Antibacterial Activity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6126.519 ^a	35	175.043	82.194	.000
Intercept	13156.148	1	13156.148	6177.670	.000
A	915.574	2	457.787	214.961	.000
Bacteria	2080.333	1	2080.333	976.852	.000
ChitosanConc	975.296	5	195.059	91.593	.000
A * Bacteria	1008.389	2	504.194	236.752	.000
A * ChitosanConc	638.315	10	63.831	29.973	.000
Bacteria * ChitosanConc	118.222	5	23.644	11.103	.000
A * Bacteria * ChitosanConc	390.389	10	39.039	18.331	.000
Error	153.333	72	2.130		
Total	19436.000	108			
Corrected Total	6279.852	107			

a. R Squared = .976 (Adjusted R Squared = .964)

Estimated Marginal Means



1. A

Estimates

Dependent Variable: Antibacterial Activity

A	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
a1	9.806	.243	9.321	10.290
a2	8.250	.243	7.765	8.735
a3	15.056	.243	14.571	15.540

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Antibacterial Activity

(I) A	(J) A	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
a1	a2	1.556*	.344	.000	.870	2.241
	a3	-5.250*	.344	.000	-5.936	-4.564
a2	a1	-1.556*	.344	.000	-2.241	-.870
	a3	-6.806*	.344	.000	-7.491	-6.120
a3	a1	5.250*	.344	.000	4.564	5.936
	a2	6.806*	.344	.000	6.120	7.491

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: Antibacterial Activity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	915.574	2	457.787	214.961	.000
Error	153.333	72	2.130		

The F tests the effect of A. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.



2. Bacteria

Estimates

Dependent Variable: Antibacterial Activity

Bacteria	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
b1	15.426	.199	15.030	15.822
b2	6.648	.199	6.252	7.044

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Antibacterial Activity

(I) Bacteria	(J) Bacteria	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
b1	b2	8.778 [*]	.281	.000	8.218	9.338
b2	b1	-8.778 [*]	.281	.000	-9.338	-8.218

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: Antibacterial Activity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	2080.333	1	2080.333	976.852	.000
Error	153.333	72	2.130		

The F tests the effect of Bacteria. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.



3. Chitosan Conc

Estimates

Dependent Variable: Antibacterial Activity

Chitosan Conc	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
c1	15.333	.344	14.648	16.019
c2	14.333	.344	13.648	15.019
c3	10.500	.344	9.814	11.186
c4	10.278	.344	9.592	10.963
c5	9.333	.344	8.648	10.019
c6	6.444	.344	5.759	7.130

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Antibacterial Activity

(I) Chitosan Conc	(J) Chitosan Conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
c1	c2	1.000*	.486	.043	.030	1.970
	c3	4.833*	.486	.000	3.864	5.803
	c4	5.056*	.486	.000	4.086	6.025
	c5	6.000*	.486	.000	5.030	6.970
	c6	8.889*	.486	.000	7.919	9.859
c2	c1	-1.000*	.486	.043	-1.970	-.030
	c3	3.833*	.486	.000	2.864	4.803
	c4	4.056*	.486	.000	3.086	5.025
	c5	5.000*	.486	.000	4.030	5.970
	c6	7.889*	.486	.000	6.919	8.859
c3	c1	-4.833*	.486	.000	-5.803	-3.864
	c2	-3.833*	.486	.000	-4.803	-2.864
	c4	.222	.486	.649	-.747	1.192
	c5	1.167*	.486	.019	.197	2.136
	c6	4.056*	.486	.000	3.086	5.025
c4	c1	-5.056*	.486	.000	-6.025	-4.086
	c2	-4.056*	.486	.000	-5.025	-3.086
	c3	-.222	.486	.649	-1.192	.747



	c5	.944	.486	.056	-.025	1.914
	c6	3.833*	.486	.000	2.864	4.803
c5	c1	-6.000*	.486	.000	-6.970	-5.030
	c2	-5.000*	.486	.000	-5.970	-4.030
	c3	-1.167*	.486	.019	-2.136	-.197
	c4	-.944	.486	.056	-1.914	.025
	c6	2.889*	.486	.000	1.919	3.859
c6	c1	-8.889*	.486	.000	-9.859	-7.919
	c2	-7.889*	.486	.000	-8.859	-6.919
	c3	-4.056*	.486	.000	-5.025	-3.086
	c4	-3.833*	.486	.000	-4.803	-2.864
	c5	-2.889*	.486	.000	-3.859	-1.919

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: Antibacterial Activity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	975.296	5	195.059	91.593	.000
Error	153.333	72	2.130		

The F tests the effect of Chitosan Conc. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.



4. A * Bacteria

Estimates

Dependent Variable: Antibacterial Activity

A	Bacteria	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
a1	b1	13.944	.344	13.259	14.630
	b2	5.667	.344	4.981	6.352
a2	b1	16.500	.344	15.814	17.186
	b2	7.161E-15	.344	-.686	.686
a3	b1	15.833	.344	15.148	16.519
	b2	14.278	.344	13.592	14.963

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Antibacterial Activity

A	(I) Bacteria	(J) Bacteria	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b
						Lower Bound
a1	b1	b2	8.278*	.486	.000	7.308
	b2	b1	-8.278*	.486	.000	-9.247
a2	b1	b2	16.500*	.486	.000	15.530
	b2	b1	-16.500*	.486	.000	-17.470
a3	b1	b2	1.556*	.486	.002	.586
	b2	b1	-1.556*	.486	.002	-2.525

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Antibacterial Activity

A	(I) Bacteria	(J) Bacteria	95% Confidence Interval for Difference
			Upper Bound
a1	b1	b2	9.247
	b2	b1	-7.308
a2	b1	b2	17.470
	b2	b1	-15.530
a3	b1	b2	2.525
	b2	b1	-.586

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).



Univariate Tests

Dependent Variable: Antibacterial Activity

A		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
a1	Contrast	616.694	1	616.694	289.578	.000
	Error	153.333	72	2.130		
a2	Contrast	2450.250	1	2450.250	1150.552	.000
	Error	153.333	72	2.130		
a3	Contrast	21.778	1	21.778	10.226	.002
	Error	153.333	72	2.130		

Each F tests the simple effects of Bacteria within each level combination of the other effects shown. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

5. A * Chitosan Conc

Estimates

Dependent Variable: Antibacterial Activity

A	Chitosan Conc	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
a1	c1	18.667	.596	17.479	19.854
	c2	17.167	.596	15.979	18.354
	c3	7.667	.596	6.479	8.854
	c4	8.500	.596	7.312	9.688
	c5	6.833	.596	5.646	8.021
	c6	-5.329E-15	.596	-1.188	1.188
a2	c1	9.667	.596	8.479	10.854
	c2	9.167	.596	7.979	10.354
	c3	8.333	.596	7.146	9.521
	c4	7.667	.596	6.479	8.854
	c5	7.500	.596	6.312	8.688
	c6	7.167	.596	5.979	8.354
a3	c1	17.667	.596	16.479	18.854
	c2	16.667	.596	15.479	17.854
	c3	15.500	.596	14.312	16.688
	c4	14.667	.596	13.479	15.854
	c5	13.667	.596	12.479	14.854
	c6	12.167	.596	10.979	13.354



Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Antibacterial Activity

A	(I) Chitosan Conc	(J) Chitosan Conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
						Lower Bound	Upper Bound
a1	c1	c2	1.500	.843	.079	-.180	3.180
		c3	11.000*	.843	.000	9.320	12.680
		c4	10.167*	.843	.000	8.487	11.846
		c5	11.833*	.843	.000	10.154	13.513
		c6	18.667*	.843	.000	16.987	20.346
	c2	c1	-1.500	.843	.079	-3.180	.180
		c3	9.500*	.843	.000	7.820	11.180
		c4	8.667*	.843	.000	6.987	10.346
		c5	10.333*	.843	.000	8.654	12.013
		c6	17.167*	.843	.000	15.487	18.846
	c3	c1	-11.000*	.843	.000	-12.680	-9.320
		c2	-9.500*	.843	.000	-11.180	-7.820
		c4	-.833	.843	.326	-2.513	.846
		c5	.833	.843	.326	-.846	2.513
		c6	7.667*	.843	.000	5.987	9.346
	c4	c1	-10.167*	.843	.000	-11.846	-8.487
		c2	-8.667*	.843	.000	-10.346	-6.987
		c3	.833	.843	.326	-.846	2.513
		c5	1.667	.843	.052	-.013	3.346
		c6	8.500*	.843	.000	6.820	10.180
	c5	c1	-11.833*	.843	.000	-13.513	-10.154
		c2	-10.333*	.843	.000	-12.013	-8.654
		c3	-.833	.843	.326	-2.513	.846
		c4	-1.667	.843	.052	-3.346	.013
c6		6.833*	.843	.000	5.154	8.513	
c6	c1	-18.667*	.843	.000	-20.346	-16.987	
	c2	-17.167*	.843	.000	-18.846	-15.487	
	c3	-7.667*	.843	.000	-9.346	-5.987	
	c4	-8.500*	.843	.000	-10.180	-6.820	
	c5	-6.833*	.843	.000	-8.513	-5.154	
a2	c1	c2	.500	.843	.555	-1.180	2.180
		c3	1.333	.843	.118	-.346	3.013
		c4	2.000*	.843	.020	.320	3.680
		c5	2.167*	.843	.012	.487	3.846
		c6	2.500*	.843	.004	.820	4.180



c2	c1		- .500	.843	.555	-2.180	1.180
		c3	.833	.843	.326	-.846	2.513
		c4	1.500	.843	.079	-.180	3.180
		c5	1.667	.843	.052	-.013	3.346
		c6	2.000*	.843	.020	.320	3.680
		c3	c1		-1.333	.843	.118
c2	-.833			.843	.326	-2.513	.846
c4	.667			.843	.431	-1.013	2.346
c5	.833			.843	.326	-.846	2.513
c6	1.167			.843	.170	-.513	2.846
c4	c1				-2.000*	.843	.020
		c2	-1.500	.843	.079	-3.180	.180
		c3	-.667	.843	.431	-2.346	1.013
		c5	.167	.843	.844	-1.513	1.846
		c6	.500	.843	.555	-1.180	2.180
		c5	c1		-2.167*	.843	.012
c2	-1.667			.843	.052	-3.346	.013
c3	-.833			.843	.326	-2.513	.846
c4	-.167			.843	.844	-1.846	1.513
c6	.333			.843	.694	-1.346	2.013
c6	c1				-2.500*	.843	.004
		c2	-2.000*	.843	.020	-3.680	-.320
		c3	-1.167	.843	.170	-2.846	.513
		c4	-.500	.843	.555	-2.180	1.180
		c5	-.333	.843	.694	-2.013	1.346
		a3	c1	c2	1.000	.843	.239
c3	2.167*			.843	.012	.487	3.846
c4	3.000*			.843	.001	1.320	4.680
c5	4.000*			.843	.000	2.320	5.680
c6	5.500*			.843	.000	3.820	7.180
c2	c1				-1.000	.843	.239
		c3	1.167	.843	.170	-.513	2.846
		c4	2.000*	.843	.020	.320	3.680
		c5	3.000*	.843	.001	1.320	4.680
		c6	4.500*	.843	.000	2.820	6.180
		c3	c1		-2.167*	.843	.012
c2	-1.167			.843	.170	-2.846	.513
c4	.833			.843	.326	-.846	2.513
c5	1.833*			.843	.033	.154	3.513
c6	3.333*			.843	.000	1.654	5.013
c4	c1				-3.000*	.843	.001



	c2	-2.000*	.843	.020	-3.680	-.320
	c3	-.833	.843	.326	-2.513	.846
	c5	1.000	.843	.239	-.680	2.680
	c6	2.500*	.843	.004	.820	4.180
c5	c1	-4.000*	.843	.000	-5.680	-2.320
	c2	-3.000*	.843	.001	-4.680	-1.320
	c3	-1.833*	.843	.033	-3.513	-.154
	c4	-1.000	.843	.239	-2.680	.680
	c6	1.500	.843	.079	-.180	3.180
c6	c1	-5.500*	.843	.000	-7.180	-3.820
	c2	-4.500*	.843	.000	-6.180	-2.820
	c3	-3.333*	.843	.000	-5.013	-1.654
	c4	-2.500*	.843	.004	-4.180	-.820
	c5	-1.500	.843	.079	-3.180	.180

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: Antibacterial Activity

A		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
a1	Contrast	1463.806	5	292.761	137.470	.000
	Error	153.333	72	2.130		
a2	Contrast	29.583	5	5.917	2.778	.024
	Error	153.333	72	2.130		
a3	Contrast	120.222	5	24.044	11.290	.000
	Error	153.333	72	2.130		

Each F tests the simple effects of Chitosan Conc within each level combination of the other effects shown. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.



6. Bacteria * Chitosan Conc

Estimates

Dependent Variable: Antibacterial Activity

Bacteria	Chitosan Conc	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
b1	c1	19.556	.486	18.586	20.525
	c2	18.111	.486	17.141	19.081
	c3	16.000	.486	15.030	16.970
	c4	15.889	.486	14.919	16.859
	c5	14.000	.486	13.030	14.970
	c6	9.000	.486	8.030	9.970
b2	c1	11.111	.486	10.141	12.081
	c2	10.556	.486	9.586	11.525
	c3	5.000	.486	4.030	5.970
	c4	4.667	.486	3.697	5.636
	c5	4.667	.486	3.697	5.636
	c6	3.889	.486	2.919	4.859

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Antibacterial Activity

Chitosan Conc	(I) Bacteria	(J) Bacteria	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b
						Lower Bound
c1	b1	b2	8.444 [*]	.688	.000	7.073
	b2	b1	-8.444 [*]	.688	.000	-9.816
c2	b1	b2	7.556 [*]	.688	.000	6.184
	b2	b1	-7.556 [*]	.688	.000	-8.927
c3	b1	b2	11.000 [*]	.688	.000	9.629
	b2	b1	-11.000 [*]	.688	.000	-12.371
c4	b1	b2	11.222 [*]	.688	.000	9.851
	b2	b1	-11.222 [*]	.688	.000	-12.594
c5	b1	b2	9.333 [*]	.688	.000	7.962
	b2	b1	-9.333 [*]	.688	.000	-10.705
c6	b1	b2	5.111 [*]	.688	.000	3.740
	b2	b1	-5.111 [*]	.688	.000	-6.482

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Antibacterial Activity

Chitosan Conc	(I) Bacteria	(J) Bacteria	95% Confidence Interval for Difference
---------------	--------------	--------------	--



			Upper Bound
c1	b1	b2	9.816
	b2	b1	-7.073
c2	b1	b2	8.927
	b2	b1	-6.184
c3	b1	b2	12.371
	b2	b1	-9.629
c4	b1	b2	12.594
	b2	b1	-9.851
c5	b1	b2	10.705
	b2	b1	-7.962
c6	b1	b2	6.482
	b2	b1	-3.740

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: Antibacterial Activity

Chitosan Conc		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
c1	Contrast	320.889	1	320.889	150.678	.000
	Error	153.333	72	2.130		
c2	Contrast	256.889	1	256.889	120.626	.000
	Error	153.333	72	2.130		
c3	Contrast	544.500	1	544.500	255.678	.000
	Error	153.333	72	2.130		
c4	Contrast	566.722	1	566.722	266.113	.000
	Error	153.333	72	2.130		
c5	Contrast	392.000	1	392.000	184.070	.000
	Error	153.333	72	2.130		
c6	Contrast	117.556	1	117.556	55.200	.000
	Error	153.333	72	2.130		

Each F tests the simple effects of Bacteria within each level combination of the other effects shown. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.



7. A * Bacteria * Chitosan Conc

Estimates

Dependent Variable: Antibacterial Activity

A	Bacteria	Chitosan Conc	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
a1	b1	c1	19.667	.843	17.987	21.346
		c2	18.000	.843	16.320	19.680
		c3	15.333	.843	13.654	17.013
		c4	17.000	.843	15.320	18.680
		c5	13.667	.843	11.987	15.346
		c6	7.105E-15	.843	-1.680	1.680
	b2	c1	17.667	.843	15.987	19.346
		c2	16.333	.843	14.654	18.013
		c3	1.776E-15	.843	-1.680	1.680
		c4	1.776E-15	.843	-1.680	1.680
		c5	1.776E-15	.843	-1.680	1.680
		c6	-1.776E-14	.843	-1.680	1.680
a2	b1	c1	19.333	.843	17.654	21.013
		c2	18.333	.843	16.654	20.013
		c3	16.667	.843	14.987	18.346
		c4	15.333	.843	13.654	17.013
		c5	15.000	.843	13.320	16.680
		c6	14.333	.843	12.654	16.013
	b2	c1	4.885E-15	.843	-1.680	1.680
		c2	6.217E-15	.843	-1.680	1.680
		c3	7.105E-15	.843	-1.680	1.680
		c4	5.773E-15	.843	-1.680	1.680
		c5	5.329E-15	.843	-1.680	1.680
		c6	1.776E-15	.843	-1.680	1.680
a3	b1	c1	19.667	.843	17.987	21.346
		c2	18.000	.843	16.320	19.680
		c3	16.000	.843	14.320	17.680
		c4	15.333	.843	13.654	17.013
		c5	13.333	.843	11.654	15.013
		c6	12.667	.843	10.987	14.346
	b2	c1	15.667	.843	13.987	17.346
		c2	15.333	.843	13.654	17.013
		c3	15.000	.843	13.320	16.680
		c4	14.000	.843	12.320	15.680
		c5	14.000	.843	12.320	15.680
		c6	11.667	.843	9.987	13.346



Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Antibacterial Activity

A	Chitosan Conc	(I) Bacteria	(J) Bacteria	Mean	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for	
				Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
a1	c1	b1	b2	2.000	1.192	.098	-.375	4.375
		b2	b1	-2.000	1.192	.098	-4.375	.375
	c2	b1	b2	1.667	1.192	.166	-.709	4.042
		b2	b1	-1.667	1.192	.166	-4.042	.709
	c3	b1	b2	15.333*	1.192	.000	12.958	17.709
		b2	b1	-15.333*	1.192	.000	-17.709	-12.958
	c4	b1	b2	17.000*	1.192	.000	14.625	19.375
		b2	b1	-17.000*	1.192	.000	-19.375	-14.625
	c5	b1	b2	13.667*	1.192	.000	11.291	16.042
		b2	b1	-13.667*	1.192	.000	-16.042	-11.291
	c6	b1	b2	2.420E-14	1.192	1.000	-2.375	2.375
		b2	b1	-2.420E-14	1.192	1.000	-2.375	2.375
a2	c1	b1	b2	19.333*	1.192	.000	16.958	21.709
		b2	b1	-19.333*	1.192	.000	-21.709	-16.958
	c2	b1	b2	18.333*	1.192	.000	15.958	20.709
		b2	b1	-18.333*	1.192	.000	-20.709	-15.958
	c3	b1	b2	16.667*	1.192	.000	14.291	19.042
		b2	b1	-16.667*	1.192	.000	-19.042	-14.291
	c4	b1	b2	15.333*	1.192	.000	12.958	17.709
		b2	b1	-15.333*	1.192	.000	-17.709	-12.958
	c5	b1	b2	15.000*	1.192	.000	12.625	17.375
		b2	b1	-15.000*	1.192	.000	-17.375	-12.625
	c6	b1	b2	14.333*	1.192	.000	11.958	16.709
		b2	b1	-14.333*	1.192	.000	-16.709	-11.958
a3	c1	b1	b2	4.000*	1.192	.001	1.625	6.375
		b2	b1	-4.000*	1.192	.001	-6.375	-1.625
	c2	b1	b2	2.667*	1.192	.028	.291	5.042
		b2	b1	-2.667*	1.192	.028	-5.042	-.291
	c3	b1	b2	1.000	1.192	.404	-1.375	3.375
		b2	b1	-1.000	1.192	.404	-3.375	1.375
	c4	b1	b2	1.333	1.192	.267	-1.042	3.709
		b2	b1	-1.333	1.192	.267	-3.709	1.042
	c5	b1	b2	-.667	1.192	.578	-3.042	1.709
		b2	b1	.667	1.192	.578	-1.709	3.042
	c6	b1	b2	1.000	1.192	.404	-1.375	3.375



b2	b1	-1.000	1.192	.404	-3.375	1.375
----	----	--------	-------	------	--------	-------

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: Antibacterial Activity

A	Chitosan Conc		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
a1	c1	Contrast	6.000	1	6.000	2.817	.098
		Error	153.333	72	2.130		
	c2	Contrast	4.167	1	4.167	1.957	.166
		Error	153.333	72	2.130		
	c3	Contrast	352.667	1	352.667	165.600	.000
		Error	153.333	72	2.130		
	c4	Contrast	433.500	1	433.500	203.557	.000
		Error	153.333	72	2.130		
	c5	Contrast	280.167	1	280.167	131.557	.000
		Error	153.333	72	2.130		
	c6	Contrast	8.787E-28	1	8.787E-28	.000	1.000
		Error	153.333	72	2.130		
a2	c1	Contrast	560.667	1	560.667	263.270	.000
		Error	153.333	72	2.130		
	c2	Contrast	504.167	1	504.167	236.739	.000
		Error	153.333	72	2.130		
	c3	Contrast	416.667	1	416.667	195.652	.000
		Error	153.333	72	2.130		
	c4	Contrast	352.667	1	352.667	165.600	.000
		Error	153.333	72	2.130		
	c5	Contrast	337.500	1	337.500	158.478	.000
		Error	153.333	72	2.130		
	c6	Contrast	308.167	1	308.167	144.704	.000
		Error	153.333	72	2.130		
a3	c1	Contrast	24.000	1	24.000	11.270	.001
		Error	153.333	72	2.130		
	c2	Contrast	10.667	1	10.667	5.009	.028
		Error	153.333	72	2.130		
	c3	Contrast	1.500	1	1.500	.704	.404
		Error	153.333	72	2.130		
	c4	Contrast	2.667	1	2.667	1.252	.267
		Error	153.333	72	2.130		



	Error	153.333	72	2.130		
c5	Contrast	.667	1	.667	.313	.578
	Error	153.333	72	2.130		
c6	Contrast	1.500	1	1.500	.704	.404
	Error	153.333	72	2.130		

Each F tests the simple effects of Bacteria within each level combination of the other effects shown. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

T-Test

Notes

Output Created		30-JUN-2025 11:12:12
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet2
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	6
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax	T-TEST GROUPS=A('a1' 'a2') /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES= الحاصل محتويات الرطوبة للزوجة محتويات البروتين /ES DISPLAY(TRUE) /CRITERIA=CI(.95).	
Resources	Processor Time	00:00:00.00
	Elapsed Time	00:00:00.00

[DataSet2]



Group Statistics

	A	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
الحاصل	a1	3	16.5633	1.31089	.75684
	a2	3	29.5500	.87727	.50649
محتوى الرطوبة	a1	3	.1567	.02309	.01333
	a2	3	.1567	.01155	.00667
الزوجة	a1	3	511.267	2.4947	1.4403
	a2	3	304.767	2.0648	1.1921
محتوى البروتين	a1	3	.002267	.0008505	.0004910
	a2	3	.001333	.0002517	.0001453

Independent Samples Test

t-test for Equality of Means

	t	df	Sig. (2-tailed)
الحاصل	-14.260	4	.000
محتوى الرطوبة	.000	4	1.000
الزوجة	110.449	4	.000
محتوى البروتين	1.823	4	.142

```
GET DATA
  /TYPE=XLSX
  /FILE='C:\Users\QS\OneDrive\Documents\Dr AZIZ.xlsx'
  /SHEET=name 'الذائبية'
  /CELLRANGE=FULL
  /READNAMES=ON
  /DATATYPEMIN PERCENTAGE=95.0
  /HIDDEN IGNORE=YES.
EXECUTE.
DATASET NAME DataSet3 WINDOW=FRONT.
ONEWAY الذائبية قابلية ربطالماء قابلية ربطالدهن محتوالرماد BY A
  /STATISTICS DESCRIPTIVES
  /MISSING ANALYSIS
  /CRITERIA=CILEVEL(0.95)
  /POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).
```



Notes

Output Created	30-JUN-2025 11:15:55	
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet3
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	9
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax	ONEWAY الدائنية قابليته بظالماء BY A قابليته بظالمه من محتو بالرماد /STATISTICS DESCRIPTIVES /MISSING ANALYSIS /CRITERIA=CILEVEL(0.95) /POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).	
Resources	Processor Time	00:00:00.02
	Elapsed Time	00:00:00.01

[DataSet3]



Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation
الذائبية	a1	3	97.533	.2517
	a2	3	96.600	.3606
	a3	3	97.000	.2000
	Total	9	97.044	.4720
قابلية ربط الماء	a1	3	225.0067	.78749
	a2	3	203.2467	13.88173
	a3	3	252.5533	32.01802
	Total	9	226.9356	27.61435
قابلية ربط الدهون	a1	3	220.3000	1.10000
	a2	3	337.3000	3.26037
	a3	3	463.9800	11.40339
	Total	9	340.5267	105.71218
محتوى الرماد	a1	3	3.70900	.016523
	a2	3	.43833	.000577
	a3	3	.42700	.001000
	Total	9	1.52478	1.638195

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
الذائبية	Between Groups	1.316	2	.658	8.457	.018
	Within Groups	.467	6	.078		
	Total	1.782	8			
قابلية ربط الماء	Between Groups	3663.464	2	1831.732	4.510	.064
	Within Groups	2436.953	6	406.159		
	Total	6100.417	8			
قابلية ربط الدهون	Between Groups	89116.765	2	44558.382	942.189	.000
	Within Groups	283.754	6	47.292		
	Total	89400.519	8			
محتوى الرماد	Between Groups	21.469	2	10.734	117387.738	.000
	Within Groups	.001	6	.000		
	Total	21.469	8			



Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) A	(J) A	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
						Lower Bound
الذائبية	a1	a2	.9333*	.2277	.006	.376
		a3	.5333	.2277	.058	-.024
	a2	a1	-.9333*	.2277	.006	-1.491
		a3	-.4000	.2277	.129	-.957
	a3	a1	-.5333	.2277	.058	-1.091
		a2	.4000	.2277	.129	-.157
قابلية ربط الماء	a1	a2	21.76000	16.45517	.234	-18.5043
		a3	-27.54667	16.45517	.145	-67.8110
	a2	a1	-21.76000	16.45517	.234	-62.0243
		a3	-49.30667*	16.45517	.024	-89.5710
	a3	a1	27.54667	16.45517	.145	-12.7177
		a2	49.30667*	16.45517	.024	9.0423
قابلية ربط الدهن	a1	a2	-117.00000*	5.61500	.000	-130.7394
		a3	-243.68000*	5.61500	.000	-257.4194
	a2	a1	117.00000*	5.61500	.000	103.2606
		a3	-126.68000*	5.61500	.000	-140.4194
	a3	a1	243.68000*	5.61500	.000	229.9406
		a2	126.68000*	5.61500	.000	112.9406
محتوى الرماد	a1	a2	3.270667*	.007808	.000	3.25156
		a3	3.282000*	.007808	.000	3.26289
	a2	a1	-3.270667*	.007808	.000	-3.28977
		a3	.011333	.007808	.197	-.00777
	a3	a1	-3.282000*	.007808	.000	-3.30111
		a2	-.011333	.007808	.197	-.03044



Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) A	(J) A	95% Confidence Interval
			Upper Bound
الذائنية	a1	a2	1.491
		a3	1.091
	a2	a1	-.376
		a3	.157
	a3	a1	.024
		a2	.957
قابلية ربط الماء	a1	a2	62.0243
		a3	12.7177
	a2	a1	18.5043
		a3	-9.0423
	a3	a1	67.8110
		a2	89.5710
قابلية ربط الدهون	a1	a2	-103.2606
		a3	-229.9406
	a2	a1	130.7394
		a3	-112.9406
	a3	a1	257.4194
		a2	140.4194
محتوى الرماد	a1	a2	3.28977
		a3	3.30111
	a2	a1	-3.25156
		a3	.03044
	a3	a1	-3.26289
		a2	.00777

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

```

GET DATA
  /TYPE=XLSX
  /FILE='C:\Users\QS\OneDrive\Documents\Dr AZIZ.xlsx'
  /SHEET=name 'ازالة الصبغة'
  /CELLRANGE=FULL
  /READNAMES=ON
  /DATATYPEMIN PERCENTAGE=95.0
  /HIDDEN IGNORE=YES.
EXECUTE.
DATASET NAME DataSet4 WINDOW=FRONT.
DATASET ACTIVATE DataSet4.
UNIANOVA إزالة الصبغة BY A B
  /METHOD=SSTYPE(3)
  /INTERCEPT=INCLUDE
  /EMMEANS=TABLES(A) COMPARE ADJ(LSD)
  /EMMEANS=TABLES(B) COMPARE ADJ(LSD)

```



```

/EMMEANS=TABLES (A*B) COMPARE (B) ADJ (BONFERRONI)
/CRITERIA=ALPHA (0.05)
/DESIGN=A B A*B.

```

Univariate Analysis of Variance

Notes

Output Created		30-JUN-2025 11:18:05
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet4
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	63
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax	UNIANOVA إزالة الصبغة BY A B /METHOD=SSTYPE(3) /INTERCEPT=INCLUDE /EMMEANS=TABLES(A) COMPARE ADJ(LSD) /EMMEANS=TABLES(B) COMPARE ADJ(LSD) /EMMEANS=TABLES(A*B) COMPARE (B) ADJ(BONFERRONI) /CRITERIA=ALPHA(0.05) /DESIGN=A B A*B.	
Resources	Processor Time	00:00:00.03
	Elapsed Time	00:00:00.02

[DataSet4]



Between-Subjects Factors

		N
A	a1	21
	a2	21
	a3	21
B	b1	9
	b2	9
	b3	9
	b4	9
	b5	9
	b6	9
	b7	9

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: إزالة الصيغة

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	393588.984 ^a	20	19679.449	874.951	.000
Intercept	2981381.349	1	2981381.349	132552.594	.000
A	357529.175	2	178764.587	7947.896	.000
B	34582.095	6	5763.683	256.254	.000
A * B	1477.714	12	123.143	5.475	.000
Error	944.667	42	22.492		
Total	3375915.000	63			
Corrected Total	394533.651	62			

a. R Squared = .998 (Adjusted R Squared = .996)



Estimated Marginal Means

1. A

Estimates

Dependent Variable: إزالة الصبغة

A	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
a1	324.000	1.035	321.911	326.089
a2	160.810	1.035	158.721	162.898
a3	167.810	1.035	165.721	169.898

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: إزالة الصبغة

(I) A	(J) A	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
a1	a2	163.190*	1.464	.000	160.237	166.144
	a3	156.190*	1.464	.000	153.237	159.144
a2	a1	-163.190*	1.464	.000	-166.144	-160.237
	a3	-7.000*	1.464	.000	-9.954	-4.046
a3	a1	-156.190*	1.464	.000	-159.144	-153.237
	a2	7.000*	1.464	.000	4.046	9.954

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: إزالة الصبغة

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	357529.175	2	178764.587	7947.896	.000
Error	944.667	42	22.492		

The F tests the effect of A. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.



2. B

Estimates

Dependent Variable: إزالة الصبغة

B	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
b1	265.111	1.581	261.921	268.301
b2	233.778	1.581	230.587	236.968
b3	219.778	1.581	216.587	222.968
b4	210.778	1.581	207.587	213.968
b5	204.667	1.581	201.476	207.857
b6	197.667	1.581	194.476	200.857
b7	191.000	1.581	187.810	194.190

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: إزالة الصبغة

(I) B	(J) B	Mean Difference			95% Confidence Interval for Difference ^b	
		(I-J)	Std. Error	Sig. ^b	Lower Bound	Upper Bound
b1	b2	31.333*	2.236	.000	26.822	35.845
	b3	45.333*	2.236	.000	40.822	49.845
	b4	54.333*	2.236	.000	49.822	58.845
	b5	60.444*	2.236	.000	55.933	64.956
	b6	67.444*	2.236	.000	62.933	71.956
	b7	74.111*	2.236	.000	69.599	78.623
	b2	b1	-31.333*	2.236	.000	-35.845
b3		14.000*	2.236	.000	9.488	18.512
b4		23.000*	2.236	.000	18.488	27.512
b5		29.111*	2.236	.000	24.599	33.623
b6		36.111*	2.236	.000	31.599	40.623
b7		42.778*	2.236	.000	38.266	47.290
b3		b1	-45.333*	2.236	.000	-49.845
	b2	-14.000*	2.236	.000	-18.512	-9.488
	b4	9.000*	2.236	.000	4.488	13.512
	b5	15.111*	2.236	.000	10.599	19.623
	b6	22.111*	2.236	.000	17.599	26.623
	b7	28.778*	2.236	.000	24.266	33.290
	b4	b1	-54.333*	2.236	.000	-58.845
b2		-23.000*	2.236	.000	-27.512	-18.488
b3		-9.000*	2.236	.000	-13.512	-4.488
b5		6.111*	2.236	.009	1.599	10.623



	b6	13.111*	2.236	.000	8.599	17.623
	b7	19.778*	2.236	.000	15.266	24.290
b5	b1	-60.444*	2.236	.000	-64.956	-55.933
	b2	-29.111*	2.236	.000	-33.623	-24.599
	b3	-15.111*	2.236	.000	-19.623	-10.599
	b4	-6.111*	2.236	.009	-10.623	-1.599
	b6	7.000*	2.236	.003	2.488	11.512
	b7	13.667*	2.236	.000	9.155	18.178
	b6	b1	-67.444*	2.236	.000	-71.956
b2		-36.111*	2.236	.000	-40.623	-31.599
b3		-22.111*	2.236	.000	-26.623	-17.599
b4		-13.111*	2.236	.000	-17.623	-8.599
b5		-7.000*	2.236	.003	-11.512	-2.488
b7		6.667*	2.236	.005	2.155	11.178
b7		b1	-74.111*	2.236	.000	-78.623
	b2	-42.778*	2.236	.000	-47.290	-38.266
	b3	-28.778*	2.236	.000	-33.290	-24.266
	b4	-19.778*	2.236	.000	-24.290	-15.266
	b5	-13.667*	2.236	.000	-18.178	-9.155
	b6	-6.667*	2.236	.005	-11.178	-2.155

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: إزالة الصبغة

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	34582.095	6	5763.683	256.254	.000
Error	944.667	42	22.492		

The F tests the effect of B. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.



3. A * B

Estimates

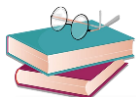
Dependent Variable: إزالة الصبغة

A	B	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
a1	b1	363.667	2.738	358.141	369.192
	b2	335.667	2.738	330.141	341.192
	b3	327.000	2.738	321.474	332.526
	b4	318.000	2.738	312.474	323.526
	b5	315.000	2.738	309.474	320.526
	b6	308.667	2.738	303.141	314.192
	b7	300.000	2.738	294.474	305.526
a2	b1	222.000	2.738	216.474	227.526
	b2	177.333	2.738	171.808	182.859
	b3	159.000	2.738	153.474	164.526
	b4	148.000	2.738	142.474	153.526
	b5	144.333	2.738	138.808	149.859
	b6	140.333	2.738	134.808	145.859
	b7	134.667	2.738	129.141	140.192
a3	b1	209.667	2.738	204.141	215.192
	b2	188.333	2.738	182.808	193.859
	b3	173.333	2.738	167.808	178.859
	b4	166.333	2.738	160.808	171.859
	b5	154.667	2.738	149.141	160.192
	b6	144.000	2.738	138.474	149.526
	b7	138.333	2.738	132.808	143.859

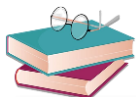
Pairwise Comparisons

Dependent Variable: إزالة الصبغة

A	(I) B	(J) B	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
						Lower Bound	Upper Bound
a1	b1	b2	28.000 [*]	3.872	.000	15.477	40.523
		b3	36.667 [*]	3.872	.000	24.144	49.189
		b4	45.667 [*]	3.872	.000	33.144	58.189
		b5	48.667 [*]	3.872	.000	36.144	61.189
		b6	55.000 [*]	3.872	.000	42.477	67.523
		b7	63.667 [*]	3.872	.000	51.144	76.189



b2	b1	-28.000 ⁺	3.872	.000	-40.523	-15.477	
	b3	8.667	3.872	.642	-3.856	21.189	
	b4	17.667 ⁺	3.872	.001	5.144	30.189	
	b5	20.667 ⁺	3.872	.000	8.144	33.189	
	b6	27.000 ⁺	3.872	.000	14.477	39.523	
	b7	35.667 ⁺	3.872	.000	23.144	48.189	
	b3	b1	-36.667 ⁺	3.872	.000	-49.189	-24.144
b2		-8.667	3.872	.642	-21.189	3.856	
b4		9.000	3.872	.526	-3.523	21.523	
b5		12.000	3.872	.073	-.523	24.523	
b6		18.333 ⁺	3.872	.001	5.811	30.856	
b7		27.000 ⁺	3.872	.000	14.477	39.523	
b4		b1	-45.667 ⁺	3.872	.000	-58.189	-33.144
	b2	-17.667 ⁺	3.872	.001	-30.189	-5.144	
	b3	-9.000	3.872	.526	-21.523	3.523	
	b5	3.000	3.872	1.000	-9.523	15.523	
	b6	9.333	3.872	.428	-3.189	21.856	
	b7	18.000 ⁺	3.872	.001	5.477	30.523	
	b5	b1	-48.667 ⁺	3.872	.000	-61.189	-36.144
b2		-20.667 ⁺	3.872	.000	-33.189	-8.144	
b3		-12.000	3.872	.073	-24.523	.523	
b4		-3.000	3.872	1.000	-15.523	9.523	
b6		6.333	3.872	1.000	-6.189	18.856	
b7		15.000 ⁺	3.872	.008	2.477	27.523	
b6		b1	-55.000 ⁺	3.872	.000	-67.523	-42.477
	b2	-27.000 ⁺	3.872	.000	-39.523	-14.477	
	b3	-18.333 ⁺	3.872	.001	-30.856	-5.811	
	b4	-9.333	3.872	.428	-21.856	3.189	
	b5	-6.333	3.872	1.000	-18.856	6.189	
	b7	8.667	3.872	.642	-3.856	21.189	
	b7	b1	-63.667 ⁺	3.872	.000	-76.189	-51.144
b2		-35.667 ⁺	3.872	.000	-48.189	-23.144	
b3		-27.000 ⁺	3.872	.000	-39.523	-14.477	
b4		-18.000 ⁺	3.872	.001	-30.523	-5.477	
b5		-15.000 ⁺	3.872	.008	-27.523	-2.477	
b6		-8.667	3.872	.642	-21.189	3.856	
a2		b1	b2	44.667 ⁺	3.872	.000	32.144
	b3		63.000 ⁺	3.872	.000	50.477	75.523
	b4		74.000 ⁺	3.872	.000	61.477	86.523
	b5		77.667 ⁺	3.872	.000	65.144	90.189
	b6		81.667 ⁺	3.872	.000	69.144	94.189



	b7	87.333 ⁺	3.872	.000	74.811	99.856	
b2	b1	-44.667 ⁺	3.872	.000	-57.189	-32.144	
	b3	18.333 ⁺	3.872	.001	5.811	30.856	
	b4	29.333 ⁺	3.872	.000	16.811	41.856	
	b5	33.000 ⁺	3.872	.000	20.477	45.523	
	b6	37.000 ⁺	3.872	.000	24.477	49.523	
	b7	42.667 ⁺	3.872	.000	30.144	55.189	
	b3	b1	-63.000 ⁺	3.872	.000	-75.523	-50.477
b2		-18.333 ⁺	3.872	.001	-30.856	-5.811	
b4		11.000	3.872	.145	-1.523	23.523	
b5		14.667 ⁺	3.872	.010	2.144	27.189	
b6		18.667 ⁺	3.872	.000	6.144	31.189	
b7		24.333 ⁺	3.872	.000	11.811	36.856	
b4		b1	-74.000 ⁺	3.872	.000	-86.523	-61.477
	b2	-29.333 ⁺	3.872	.000	-41.856	-16.811	
	b3	-11.000	3.872	.145	-23.523	1.523	
	b5	3.667	3.872	1.000	-8.856	16.189	
	b6	7.667	3.872	1.000	-4.856	20.189	
	b7	13.333 ⁺	3.872	.028	.811	25.856	
	b5	b1	-77.667 ⁺	3.872	.000	-90.189	-65.144
b2		-33.000 ⁺	3.872	.000	-45.523	-20.477	
b3		-14.667 ⁺	3.872	.010	-27.189	-2.144	
b4		-3.667	3.872	1.000	-16.189	8.856	
b6		4.000	3.872	1.000	-8.523	16.523	
b7		9.667	3.872	.348	-2.856	22.189	
b6		b1	-81.667 ⁺	3.872	.000	-94.189	-69.144
	b2	-37.000 ⁺	3.872	.000	-49.523	-24.477	
	b3	-18.667 ⁺	3.872	.000	-31.189	-6.144	
	b4	-7.667	3.872	1.000	-20.189	4.856	
	b5	-4.000	3.872	1.000	-16.523	8.523	
	b7	5.667	3.872	1.000	-6.856	18.189	
	b7	b1	-87.333 ⁺	3.872	.000	-99.856	-74.811
b2		-42.667 ⁺	3.872	.000	-55.189	-30.144	
b3		-24.333 ⁺	3.872	.000	-36.856	-11.811	
b4		-13.333 ⁺	3.872	.028	-25.856	-.811	
b5		-9.667	3.872	.348	-22.189	2.856	
b6		-5.667	3.872	1.000	-18.189	6.856	
a3		b1	b2	21.333 ⁺	3.872	.000	8.811
	b3		36.333 ⁺	3.872	.000	23.811	48.856
	b4		43.333 ⁺	3.872	.000	30.811	55.856
	b5		55.000 ⁺	3.872	.000	42.477	67.523



	b6	65.667*	3.872	.000	53.144	78.189
	b7	71.333*	3.872	.000	58.811	83.856
b2	b1	-21.333*	3.872	.000	-33.856	-8.811
	b3	15.000*	3.872	.008	2.477	27.523
	b4	22.000*	3.872	.000	9.477	34.523
	b5	33.667*	3.872	.000	21.144	46.189
	b6	44.333*	3.872	.000	31.811	56.856
	b7	50.000*	3.872	.000	37.477	62.523
b3	b1	-36.333*	3.872	.000	-48.856	-23.811
	b2	-15.000*	3.872	.008	-27.523	-2.477
	b4	7.000	3.872	1.000	-5.523	19.523
	b5	18.667*	3.872	.000	6.144	31.189
	b6	29.333*	3.872	.000	16.811	41.856
	b7	35.000*	3.872	.000	22.477	47.523
b4	b1	-43.333*	3.872	.000	-55.856	-30.811
	b2	-22.000*	3.872	.000	-34.523	-9.477
	b3	-7.000	3.872	1.000	-19.523	5.523
	b5	11.667	3.872	.092	-.856	24.189
	b6	22.333*	3.872	.000	9.811	34.856
	b7	28.000*	3.872	.000	15.477	40.523
b5	b1	-55.000*	3.872	.000	-67.523	-42.477
	b2	-33.667*	3.872	.000	-46.189	-21.144
	b3	-18.667*	3.872	.000	-31.189	-6.144
	b4	-11.667	3.872	.092	-24.189	.856
	b6	10.667	3.872	.182	-1.856	23.189
	b7	16.333*	3.872	.003	3.811	28.856
b6	b1	-65.667*	3.872	.000	-78.189	-53.144
	b2	-44.333*	3.872	.000	-56.856	-31.811
	b3	-29.333*	3.872	.000	-41.856	-16.811
	b4	-22.333*	3.872	.000	-34.856	-9.811
	b5	-10.667	3.872	.182	-23.189	1.856
	b7	5.667	3.872	1.000	-6.856	18.189
b7	b1	-71.333*	3.872	.000	-83.856	-58.811
	b2	-50.000*	3.872	.000	-62.523	-37.477
	b3	-35.000*	3.872	.000	-47.523	-22.477
	b4	-28.000*	3.872	.000	-40.523	-15.477
	b5	-16.333*	3.872	.003	-28.856	-3.811
	b6	-5.667	3.872	1.000	-18.189	6.856

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.



Univariate Tests

Dependent Variable: إزالة الصبغة

A		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
a1	Contrast	7940.000	6	1323.333	58.836	.000
	Error	944.667	42	22.492		
a2	Contrast	16676.571	6	2779.429	123.574	.000
	Error	944.667	42	22.492		
a3	Contrast	11443.238	6	1907.206	84.795	.000
	Error	944.667	42	22.492		

Each F tests the simple effects of B within each level combination of the other effects shown. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Univariate Analysis of Variance

Notes

Output Created		30-JUN-2025 11:19:25
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet4
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
Syntax	UNIANOVA AntioxidantActivity BY A B /METHOD=SSTYPE(3) /INTERCEPT=INCLUDE /EMMEANS=TABLES(A) COMPARE ADJ(LSD) /EMMEANS=TABLES(B) COMPARE ADJ(LSD) /EMMEANS=TABLES(A*B) COMPARE (B) ADJ(BONFERRONI) /CRITERIA=ALPHA(0.05) /DESIGN=A B A*B.	
Resources	Processor Time	00:00:00.00
	Elapsed Time	00:00:00.00

```

UNIANOVA AntioxidantActivity BY A B
/METHOD=SSTYPE(3)
/INTERCEPT=INCLUDE
/EMMEANS=TABLES(A) COMPARE ADJ(LSD)
/EMMEANS=TABLES(B) COMPARE ADJ(LSD)
/EMMEANS=TABLES(A*B)
/CRITERIA=ALPHA(0.05)
/DESIGN=A B A*B.

```



Univariate Analysis of Variance

Notes

Output Created	30-JUN-2025 11:20:24	
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet4
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	63
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax	UNIANOVA AntioxidantActivity BY A B /METHOD=SSTYPE(3) /INTERCEPT=INCLUDE /EMMEANS=TABLES(A) COMPARE ADJ(LSD) /EMMEANS=TABLES(B) COMPARE ADJ(LSD) /EMMEANS=TABLES(A*B) /CRITERIA=ALPHA(0.05) /DESIGN=A B A*B.	
Resources	Processor Time	00:00:00.02
	Elapsed Time	00:00:00.02

Between-Subjects Factors

		N
A	a1	21
	a2	21
	a3	21
B	b1	9
	b2	9
	b3	9
	b4	9
	b5	9
	b6	9
	b7	9



Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Antioxidant Activity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	858.738 ^a	20	42.937	44.756	.000
Intercept	2194.151	1	2194.151	2287.103	.000
A	568.026	2	284.013	296.045	.000
B	262.293	6	43.715	45.567	.000
A * B	28.419	12	2.368	2.469	.015
Error	40.293	42	.959		
Total	3093.182	63			
Corrected Total	899.031	62			

a. R Squared = .955 (Adjusted R Squared = .934)

Estimated Marginal Means

1. A

Estimates

Dependent Variable: Antioxidant Activity

A	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
a1	10.108	.214	9.677	10.540
a2	3.296	.214	2.865	3.728
a3	4.300	.214	3.868	4.731

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Antioxidant Activity

(I) A	(J) A	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
a1	a2	6.812*	.302	.000	6.202	7.422
	a3	5.808*	.302	.000	5.198	6.418
a2	a1	-6.812*	.302	.000	-7.422	-6.202
	a3	-1.003*	.302	.002	-1.613	-.393



a3	a1	-5.808*	.302	.000	-6.418	-5.198
	a2	1.003*	.302	.002	.393	1.613

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: Antioxidant Activity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	568.026	2	284.013	296.045	.000
Error	40.293	42	.959		

The F tests the effect of A. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

2. B

Estimates

Dependent Variable: Antioxidant Activity

B	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
b1	3.421	.326	2.763	4.080
b2	4.017	.326	3.358	4.676
b3	4.529	.326	3.870	5.188
b4	5.446	.326	4.787	6.105
b5	6.828	.326	6.169	7.487
b6	7.388	.326	6.730	8.047
b7	9.681	.326	9.022	10.340

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Antioxidant Activity

(I) B	(J) B	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
b1	b2	-.596	.462	.204	-1.527	.336
	b3	-1.108*	.462	.021	-2.039	-.176
	b4	-2.025*	.462	.000	-2.957	-1.093
	b5	-3.406*	.462	.000	-4.338	-2.474
	b6	-3.967*	.462	.000	-4.899	-3.035
	b7	-6.259*	.462	.000	-7.191	-5.327



b2	b1	.596	.462	.204	-.336	1.527
	b3	-.512	.462	.274	-1.444	.420
	b4	-1.429*	.462	.003	-2.361	-.497
	b5	-2.811*	.462	.000	-3.742	-1.879
	b6	-3.371*	.462	.000	-4.303	-2.440
	b7	-5.664*	.462	.000	-6.595	-4.732
	b3	b1	1.108*	.462	.021	.176
b2		.512	.462	.274	-.420	1.444
b4		-.917	.462	.054	-1.849	.015
b5		-2.299*	.462	.000	-3.230	-1.367
b6		-2.859*	.462	.000	-3.791	-1.928
b7		-5.152*	.462	.000	-6.083	-4.220
b4		b1	2.025*	.462	.000	1.093
	b2	1.429*	.462	.003	.497	2.361
	b3	.917	.462	.054	-.015	1.849
	b5	-1.381*	.462	.005	-2.313	-.450
	b6	-1.942*	.462	.000	-2.874	-1.010
	b7	-4.234*	.462	.000	-5.166	-3.303
	b5	b1	3.406*	.462	.000	2.474
b2		2.811*	.462	.000	1.879	3.742
b3		2.299*	.462	.000	1.367	3.230
b4		1.381*	.462	.005	.450	2.313
b6		-.561	.462	.231	-1.493	.371
b7		-2.853*	.462	.000	-3.785	-1.921
b6		b1	3.967*	.462	.000	3.035
	b2	3.371*	.462	.000	2.440	4.303
	b3	2.859*	.462	.000	1.928	3.791
	b4	1.942*	.462	.000	1.010	2.874
	b5	.561	.462	.231	-.371	1.493
	b7	-2.292*	.462	.000	-3.224	-1.360
	b7	b1	6.259*	.462	.000	5.327
b2		5.664*	.462	.000	4.732	6.595
b3		5.152*	.462	.000	4.220	6.083
b4		4.234*	.462	.000	3.303	5.166
b5		2.853*	.462	.000	1.921	3.785
b6		2.292*	.462	.000	1.360	3.224

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).



Univariate Tests

Dependent Variable: Antioxidant Activity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	262.293	6	43.715	45.567	.000
Error	40.293	42	.959		

The F tests the effect of B. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

3. A * B

Dependent Variable: Antioxidant Activity

A	B	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
a1	b1	6.435	.565	5.294	7.577
	b2	7.321	.565	6.180	8.463
	b3	8.102	.565	6.961	9.243
	b4	10.260	.565	9.119	11.401
	b5	11.941	.565	10.800	13.082
	b6	12.741	.565	11.600	13.882
	b7	13.957	.565	12.816	15.099
a2	b1	1.872	.565	.731	3.013
	b2	1.952	.565	.811	3.093
	b3	2.139	.565	.998	3.280
	b4	2.406	.565	1.265	3.547
	b5	4.011	.565	2.870	5.152
	b6	3.476	.565	2.335	4.617
	b7	7.219	.565	6.078	8.360
a3	b1	1.957	.565	.816	3.098
	b2	2.778	.565	1.636	3.919
	b3	3.346	.565	2.205	4.488
	b4	3.673	.565	2.531	4.814
	b5	4.531	.565	3.390	5.672
	b6	5.948	.565	4.807	7.090
	b7	7.866	.565	6.724	9.007



The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
University of Misan
College of Basic Education



**A Thesis Submitted to the Council of the College of Basic
Education – University of Misan**

**In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree
of Master of Science in General Specialized Sciences**

**"Isolation and Characterization of Chitosan
from Local Fish Scale Waste and the Study
of Some of Its Biological Properties"**

Prepared by:

Maryam Younis Hassan

Supervised by:

Prof. Dr. Wasan Jaafar Ibrahim

2025 AH

1447 AD



Abstract

The present study aimed to extract chitosan from the scales of two local fish species, *Tenualosa ilisha* (suboor) and *Cyprinus carpio* (shemty), using the chemical method, and to evaluate some of its functional, physicochemical, and biological properties. The extraction process included deproteinization, demineralization, and deacetylation steps. The chitosan yield was 16.56% for suboor and 29.55% for shemty.

The physicochemical characteristics revealed a decrease in protein content (0.014% for suboor and 0.0014% for shemty) and ash content (0.438% for suboor and 0.427% for shemty), indicating the efficiency of the deproteinization and demineralization processes. No significant differences were observed in the degree of deacetylation, which reached 86.19% for suboor and 85% for shemty. Based on these results, both types of chitosan were classified as Highly Deacetylated Degree (HDD) chitosan.

FTIR analysis confirmed the presence of characteristic absorption bands of amino ($-\text{NH}_2$), carbonyl ($\text{C}=\text{O}$), and ether ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) groups, indicating the successful deacetylation of chitin into high-purity chitosan. XRD results showed crystallinity degrees of 64.42% for suboor and 64.59% for shemty, demonstrating a well-ordered crystalline structure as a result of the efficient extraction process.

The extracted chitosan exhibited high solubility in acidic medium (1% acetic acid), exceeding 96% for both types. The shemty chitosan showed significantly lower molecular weight and viscosity than suboor chitosan, with values of 126.765 KDa and 30.477 cPs, respectively, compared to 226.1 KDa and 51.126 cPs for suboor chitosan.

Regarding functional properties, shemty chitosan exhibited higher oil binding capacity (463.98%) compared to suboor (337.3%), while no significant



differences were observed in water binding capacity, recorded at 350.8% and 360.9%, respectively.

For antibacterial activity, shemty chitosan demonstrated a strong inhibitory effect against both Gram-negative *Escherichia coli* and Gram-positive *Staphylococcus aureus* at concentrations of (0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, and 2.00 $\mu\text{g/ml}$). The inhibition zones for *E. coli* were (19.67, 18.00, 16.00, 15.33, 13.33, and 12.67 mm), while for *Staph. aureus* they were (15.67, 15.33, 15.00, 14.00, and 11.67 mm), respectively. In contrast, suboor chitosan inhibited the growth of *E. coli* at all concentrations (19.33, 18.33, 16.67, 15.33, and 14.33 mm), whereas *Staph. aureus* showed resistance to suboor chitosan with no inhibition zones recorded.

These findings confirm that fish scale wastes of suboor and shemty can serve as promising sources for the production of high-quality chitosan with excellent physicochemical, functional, and biological properties, supporting its potential use in industrial, medical, and environmental applications.